

2005

00557

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



“PAPEL DEL GABA EN LA REGULACIÓN DE LA  
BIOSÍNTESIS DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH) EN  
EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO DE LA RATA”

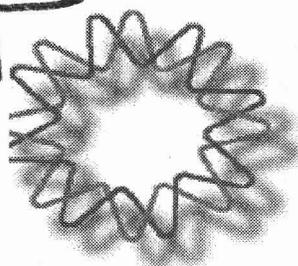
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A L A  
BIOL. VICENTA TRUJILLO ALONSO

CUERNAVACA MORELOS, JUNIO DEL 2005

Trujillo Alonso, Vicenta



m. 345214



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

Este trabajo se realizó en el laboratorio de neuroendocrinología molecular del departamento de genética y fisiología molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Rosa Maria Uribe Villegas.

### COMITE TUTORAL:

Dra. Rosa Maria Uribe Villegas (asesor).

Dra. Diana Escalante Alcalde.

Dra. Teresa Morales Guzmán.

### JURADO DE EXAMEN:

Presidente: Dra. Hilda Lomelí Buyoli.

Secretario: Dra. Rosa María Uribe Villegas.

Vocal: Dra. Teresa Morales Guzmán.

Suplente: Dra Carmen Beltrán Núñez.

Suplente: Dr. Ernesto Méndez Salinas.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Vicente Trujillo Alonso

FECHA: 9/06/2005

FIRMA: Vicente Trujillo

## AGRADECIMIENTOS

\*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por asignarme una beca durante mis estudios de maestría en el período de agosto de 2002 a agosto de 2004.

\*Al Instituto de Biotecnología-UNAM, por financiar mi asistencia al XXV Congreso Nacional de Ciencias Bioquímicas.

\*A la Dra. Patricia Joseph Bravo y al Dr. Jean Louis Charli por permitirme participar en su grupo de trabajo así como por su crítica a lo largo de este proyecto.

\*Al Q.F.B. Miguel Cisneros, Sergio Gonzales y Manuel Villa por su apoyo técnico durante el desarrollo del presente trabajo.

\*A la Dra. Rosa Maria Uribe Villegas por dirigir este trabajo y por su interés constante en mi desarrollo profesional.

\*A todos mis compañeros y amigos del laboratorio.

A Diana

A mis padres, hermanos y sobrinos.

# ÍNDICE

## Página

Resumen	9
I. INTRODUCCIÓN	
1. La hormona liberadora de tirotropina (TRH).	11
2. Estructura del gen y biosíntesis de la TRH.	12
3. Regulación de la biosíntesis de la TRH en el Núcleo Paraventricular del Hipotálamo (NPV) de la rata.	
3.1 Aferencias nerviosas y periféricas que reciben las neuronas TRHérgicas del NPV.	14
3.2 Regulación de la biosíntesis de la TRH en el NPV.	15
4. Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).	19
4.1. Receptores de GABA tipo A (GABAR-A).	20
4. 2. Receptores de GABA tipo B (GABAR-B).	21
4. 3. Receptores de GABA tipo C (GABAR-C).	21
5. Participación del GABA en el Control Neuroendocrino (NPV-Pituitaria)	24
II. Hipótesis.	28
III. Objetivos.	28
IV. Estrategia Experimental.	29
V. Materiales y Métodos.	
1. Animales.	30
2. Extracción de la TRH del Hipotálamo Medio Basal (HMB).	31
3. Radioinmunoensayo (RIA) del péptido TRH en el HMB, corticosterona, tirotropina y prolactina en suero.	32
4. Determinación de la concentración de la TRH en HMB y hormonas: corticosterona, tirotropina y prolactina en el suero.	32
5. Disección del núcleo paraventricular y área preóptica/hipotálamo anterior.	33
6. Extracción de RNA total.	34
7. Marcaje de las sondas: DNAC de la TRH y DNAC de ciclofilina y el oligonucleótido antisentido del RNAm de la TRH.	
7. 1 Sondas de DNAC.	34
7.1.1 Purificación de las sondas.	35

7. 2 Oligonucleótido antisentido del RNAm de la TRH.	36
8. Electroforesis en gel desnaturalizante, transferencia a membranas de nilón y post-hibridación.	36
9. Hibridación <i>in situ</i> .	
9. 1 Preparación de los tejidos, hibridación y posthibridación.	38
9. 2 Autorradiografía	39
9. 3. Microautorradiografía	39
10. Combinación de inmunohistoquímica con hibridación <i>in situ</i>	39
11. Análisis densitométrico semicuantitativo del nivel de expresión del RNAm de TRH en el NPV	40
12. Conteo de células positivas al RNAmTRH, c-Fos y RNAmTRH/c-Fos.	40
13. Análisis estadísticos	41
VI. Resultados.	
1. Efecto de la inyección intracerebroventricular de GABA y bicuculina sobre nivel de expresión del RNAm de la TRH en el NPV y área preóptica, el contenido celular de TRH en el HMB y la concentración de corticosterona, tirotrópina y prolactina en suero.	42
2. Efecto de la microinyección en el NPV derecho de GABA o bicuculina sobre el nivel de RNAm de TRH en el NPV.	45
3. Detección de la proteína c-Fos en las neuronas TRHérgicas del NPV.	47
VII. Discusión.	53
VIII. Conclusiones.	57
IX. Perspectivas.	57
X. Referencias.	58

## ABREVIATURAS

- aa: Aminoácido.
- ABC: Complejo de avidina biotina (vector).
- ACTH: Hormona adrenocorticotrópica o corticotropina.
- AGRP: Proteína relacionada con el péptido agutí.
- AMPc: Monofosfato de adenosina cíclico.
- ANOVA: Análisis de varianza.
- AP/HA: Área preóptica/hipotálamo anterior.
- APSA: Ácido 3-aminopropano-sulfónico.
- AVP: Arginina vasopresina.
- BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro.
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- CACA: Ácido carboxílico -cis-2-aminometil-ciclopropano.
- DTT: Ditioneitol.
- DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
- CART: Transcrito regulado por anfetamina y cocaína.
- CREB: Proteína de unión al sitio de respuesta a AMPc.
- CRH: Hormona liberadora de corticotropina.
- DAB: 3,3'-Diaminobenzidina.
- DNAc: Ácido desoxirribonucleico complementario.
- DOI: Densidad óptica integrada
- EGFRE: Elemento de respuesta al factor de crecimiento epidermal.
- EM: Eminencia media.
- ESM: Error estándar de la media.
- GABA: Ácido  $\gamma$ -aminobutírico.
- GABAR-A: Receptores de GABA tipo A.
- GABAR-B: Receptores de GABA tipo B.
- GABAR-C: Receptores de GABA tipo C.
- GABA-T: 4-amino-butirato-2-oxoglutarato aminotransferasa.
- GAD: Descarboxilasa de ácido glutámico.
- GC: Glucocorticoides.
- GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico.

GPCRs: Receptores acoplados a proteínas G.

GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides.

HMB: Hipotálamo medio basal.

H-P-A: Eje Hipotálamo-pituitaria-adrenal.

H-P-T: Eje Hipotálamo-pituitaria-tiroides.

HP-228: Inhibidor específico de la oxido nítrico sintasa.

I4AA: Ácido imidazol-4-acético.

ICV: Intracerebroventricular.

iNOS: Oxido nítrico sintasa inducida.

IPSC: Corriente postsináptica inhibitoria.

$\alpha$ -MSH: Hormona estimulante de los melanocitos.

NPV: Núcleo paraventricular.

NPY: Neuropeptido Y.

PAM: Peptidil-glicil  $\alpha$ -monooxigenasa.

PPA: Ácido piperidine-4- sulfónico.

PRL: Prolactina.

RER: Retículo endoplásmico rugoso.

RIA: Radioinmunoensayo.

RNAhn: Ácido ribonucleico heteronuclear.

RNAm: Ácido ribonucleico mensajero.

SNC: Sistema nervioso central.

SPIRE: Elemento de respuesta a SP1.

TA: Temperatura ambiente.

TACA: Ácido trans-4-aminocrotónico.

T<sub>3</sub>: Triiodotironina.

T<sub>4</sub>: Tetraiodotironina o tiroxina.

THIP: Ácido 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo (5, 4c)-3-ol-piridina.

THRE: Elemento de respuesta al receptor de hormona tiroidea.

TPMPA: Ácido 1,2,5,6 tetrahidropiridina-4-il-metil-fosfónico.

TRH: Hormona liberadora de tirotrópina.

TSH: Hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina.

## RESUMEN

Las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV juegan un papel importante en el control homeostático del organismo al integrar señales extracelulares tanto del interior como del exterior del mismo. Estas neuronas son blanco de diferentes moléculas de señalización, encontrándose neurotransmisores, neuropéptidos, hormonas y factores tróficos. Recientemente, se demostró que una gran cantidad de somas TRHérgicos del NPV reciben contactos sinápticos GABAérgicos sugiriendo que este neurotransmisor podría regular la biosíntesis del péptido en dichas neuronas. Con el fin de definir esta hipótesis, se administró GABA [5µm], bicuculina [250 o 500pm] o solución salina en el ventrículo lateral derecho (ICV) de ratas provistas con una cánula guía. La aplicación ICV de GABA no afectó el nivel basal de TRHmRNA en el NPV pero disminuyó significativamente en un 25% y 28% ( $p < 0.05$ ) el contenido celular de TRH y TRH-gly respectivamente del hipotálamo medio basal. Detectamos en estos animales que el nivel circulante de TSH también disminuyó en un 36% ( $p < 0.05$ ). Por otro lado la inyección de bicuculina [500pm] incrementó en un 63 % ( $p < 0.05$ ) el nivel del RNAm de TRH en el NPV, mientras que no modificó la TSH en suero e incrementó en un 100% ( $p < 0.05$ ) la prolactina sérica. En este paradigma cuantificamos el nivel de RNAm de TRH en el área preóptica/hipotálamo anterior, región que también esta altamente inervada por conexiones GABAérgicas. A diferencia de lo observado con el NPV, la inyección ICV de GABA inhibió significativamente en un 37% ( $p < 0.05$ ) el nivel RNAm de TRH, mientras que la aplicación de bicuculina [500pm] causó un aumento significativo en un 79% ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que en el área preóptica el GABA regula negativamente la biosíntesis de TRH a través del receptor de GABA tipo A mientras que en el NPV el efecto podría ser indirecto. Con el fin de resolver esta pregunta, se implantaron animales con una cánula guía sobre el NPV derecho y se inyectaron con GABA [0.5µm], bicuculina [100pm] o salina, los animales se sacrificaron 1h después. Nuevamente, en el NPV no observamos una relación inversa en los efectos del GABA y el antagonista del receptor tipo A. Mientras que la aplicación de GABA generó una disminución en un 35% y 28% ( $p < 0.05$ ) en el RNAm de TRH en el NPV derecho e izquierdo respectivamente medido por hibridación *in situ*, la bicuculina no modificó significativamente el nivel de RNAm de TRH en el NPV. Previamente se demostró que perfusión del NPV con bicuculina [100pm] induce la expresión de la proteína c-Fos en la región parvocelular del NPV, donde se localizan las neuronas TRHérgicas. Por lo que determinamos si la expresión de c-Fos ocurría en las

neuronas TRHérgicas como un indicador de activación de las mismas. Si bien detectamos un aumento significativo en un 87% ( $p < 0.05$ ) en el número de células positivas a c-Fos inmunoreactivo, no encontramos cambios significativos en el número de neuronas TRHérgicas positivas a c-Fos. En conclusión demostramos que el GABA regula directa e indirectamente la biosíntesis de la TRH en las neuronas del área preóptica y NPV a través de un mecanismo independiente a la activación de c-Fos.

## I. INTRODUCCIÓN.

El hipotálamo es un centro regulador de numerosas y diversas funciones fisiológicas que incluyen: el crecimiento, el metabolismo celular, la respuesta al estrés, la reproducción, la osmorregulación y el ritmo circadiano entre otras. Todas estas funciones están involucradas en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos y en la coordinación oportuna de funciones fisiológicas con las condiciones ambientales. Para lograr esto, el hipotálamo integra la información sensorial relacionada con el ambiente interno y el externo de los organismos. El hipotálamo responde rápidamente a esta información mediante respuestas neuroendocrinas y autonómicas con la liberación de neurotransmisores, neuropéptidos y factores tróficos a las células blanco dentro y fuera del sistema nervioso central (SNC) (1).

### *1.1 HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)*

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) fue el primer péptido hipofisiotrópico aislado y caracterizado en 1969. Su caracterización química fue la primera evidencia directa de la existencia de hormonas hipofisiotrópicas en el hipotálamo (2-3). La TRH funciona como neurohormona y se sintetiza en neuronas del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo que proyectan sus terminales nerviosas hacia la eminencia media (EM); de donde se libera en respuesta a un estímulo. Una vez liberada, se transporta por el sistema portahipofisario a la adenohipófisis donde estimula la síntesis y la secreción de prolactina (PRL) y tirotrópina (TSH); las cuales a su vez son responsables de controlar la secreción de leche (entre otras) y de hormonas tiroideas: triiodotironina y tiroxina (T3 y T4) respectivamente (4-7).

Otros núcleos hipotalámicos que sintetizan TRH son: el preóptico, el anterior, el lateral, el dorsomedial, el supraóptico, el periventricular y el supraquiasmático así como los núcleos: dimórfico sexual, medial y lateral del área preóptica (8-9). Fuera del hipotálamo, la TRH se sintetiza en la amígdala, hipocampo, bulbo olfatorio, el núcleo reticular talámico, el tallo cerebral (núcleos del rafé) y pituitaria (9-11). También se ha detectado la TRH y su RNAm en órganos periféricos como son: el páncreas, el corazón, el tracto digestivo y los testículos (12-15). Además de su papel como neurohormona se ha propuesto que la TRH participa en la modulación de otras actividades biológicas como son: la termorregulación, la memoria, el control de la motilidad gastrointestinal, la secreción del ácido gástrico, la vasodilatación y la modulación del sistema inmune (16).

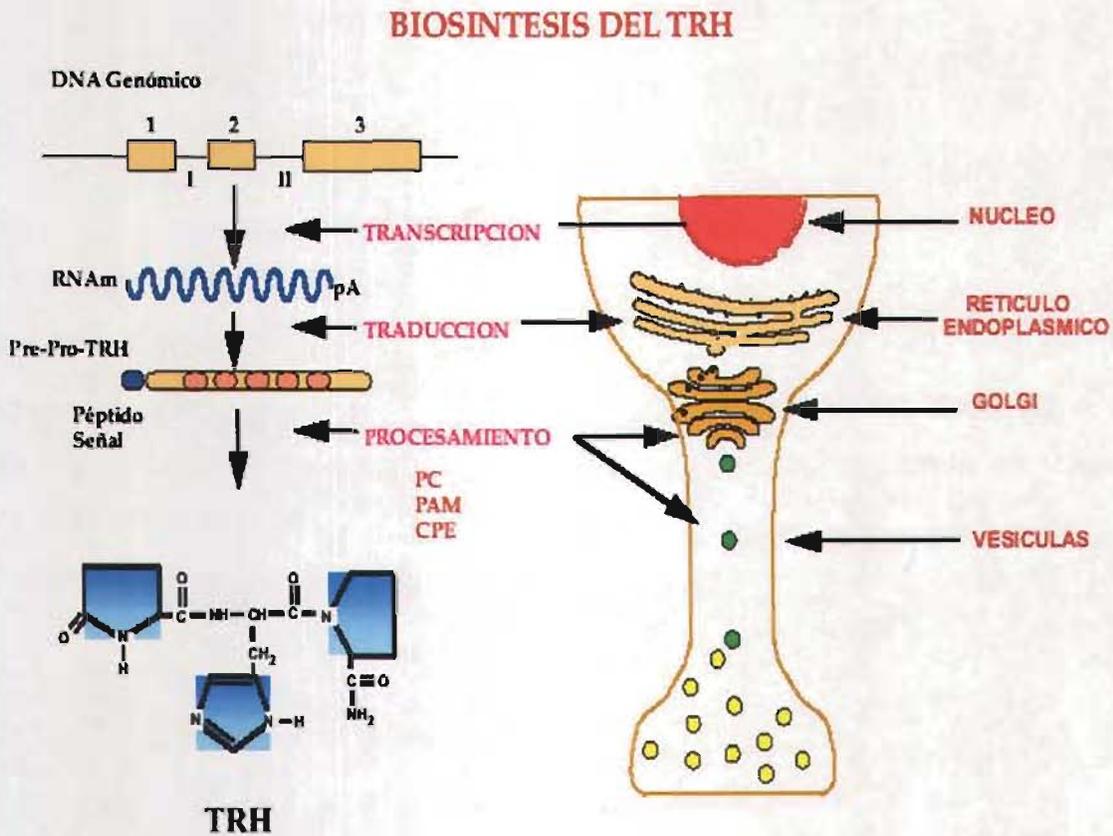
## 1.2 ESTRUCTURA DEL GEN Y BIOSÍNTESIS DE LA TRH

Sólo un gen que codifica para la TRH se ha aislado del genoma de humano, la rata y el ratón (17-19). La región promotora 5' del gen de la TRH de rata contiene las cajas típicas TATA (-29pb) y GC (un elemento de respuesta a SP1, SPIRE), dos elementos de respuesta al factor de crecimiento epidermal (EGFRE), dos secuencias imperfectas de unión para la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), el factor de transcripción AP1, dos elementos de respuesta a los receptores de hormonas tiroideas (THRE) así como cuatro elementos de respuesta a los receptores de glucocorticoides (GRE). Además contiene una secuencia similar a la secuencia presente en el gen del péptido natriurético atrial que confiere expresión tejido-específica y es homóloga al elemento de respuesta del suero y una secuencia idéntica a un enhancer neuronal específico (18).

La TRH es un tripéptido (L-piroglutamil-L-histidil-L-prolinamida) que al igual que la mayoría de los péptidos de secreción, se sintetiza a partir del corte proteolítico de un precursor peptídico de peso molecular elevado. La unidad transcripcional de la TRH tiene 2.6 kilobases y contiene tres exones interrumpidos por dos intrones. El primer exón codifica para la región 5' no traducida del RNAm específico, el segundo exón codifica para la secuencia señal y una parte del extremo amino terminal del propéptido y el tercer exón codifica para las cinco secuencias repetidas del proTRH (Lys-Arg ó Arg-Arg-Gln-His-Pro-Gly-Lys-Arg ó Arg-Arg) y la región 3' no traducida del RNAm (20).

La TRH se origina a partir de un RNAm primario sintetizado en el núcleo celular (Fig. 1); donde además sufre modificaciones post-transcripcionales para convertirse en RNA maduro; luego es transportado al citoplasma para ser traducido por los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER), generándose así un precursor peptídico preproTRH de peso molecular elevado (255aa; 29247 daltones). El precursor es internalizado en el retículo a través de su péptido señal. En el lumen del RER algunos precursores peptídicos sufren modificaciones estructurales para adquirir una estructura secundaria específica. Hasta el momento para el proTRH no han sido reportadas. Posteriormente el ProTRH es transportado en vesículas al Aparato de Golgi, donde inicia el procesamiento del proTRH por las enzimas PC1 y/o PC2 y se empaqueta en vesículas de transporte junto con las enzimas de procesamiento proteolítico, las cuales continúan con el procesamiento del proTRH durante su transporte al axón, durante este trayecto sufre otras modificaciones como son: la ciclización del grupo amino terminal por la glutamil ciclasa formando un grupo piroglu y la

formación de un extremo carboxilo terminal amidado por medio de la peptidil-glicin  $\alpha$ -monooxigenasa (PAM) generándose así el tripéptido activo (Piroglu-His-ProNH<sub>2</sub>); el cual se almacena en vesículas cercanas a la membrana plasmática, de donde es liberado en respuesta a un estímulo.



**Fig 1. Representación gráfica del proceso de biosíntesis de la TRH.** La biosíntesis de la TRH inicia en el núcleo celular, donde se sintetiza un RNAm; el cual es posteriormente traducido en los ribosomas del RER generándose un precursor peptídico de peso molecular elevado que contiene la secuencia del péptido TRH repetida cinco veces. Durante su transporte a la terminal nerviosa, el péptido sufre las últimas modificaciones para convertirse en el péptido activo, el cual se almacena en vesículas de secreción en la terminal nerviosa.

### 1.3 REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE LA TRH EN EL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO DE LA RATA

#### 1.3. 1 Aferencias nerviosas y periféricas que reciben las neuronas TRHérgicas del NPV.

Las neuronas TRHérgicas del NPV reciben inervación adrenérgica y noradrenérgica de varios grupos celulares A1, A2 y A6 de la médula espinal (21-22). Recientemente se demostró que varios de estos grupos neuronales coexpresan adrenalina y CART (un transcrito regulado por amfetamina y cocaína) e inervan aproximadamente el 50% de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas (23). Por otro lado, la combinación de inmunohistoquímica para TRH con autoradiografía de la unión de serotonina a su receptor, ha confirmado conexiones sinápticas entre terminales nerviosas serotoninérgicas del núcleo del rafé y somas neuronales sintetizando TRH (24). Además estudios electrofisiológicos realizados por el grupo del Dr. Boudada (25) mostraron que el NPV está rodeado por una población substancial de neuronas GABAérgicas locales, sugiriendo que las neuronas TRHérgicas podrían ser reguladas también por el ácido gamma aminobutírico (GABA). En apoyo a esta propuesta, el grupo del Dr. Lechan (26) demostró conexiones sinápticas entre terminales locales GABAérgicas y neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV mediante la combinación de inmunohistoquímica con hibridación *in situ* y análisis por microscopía electrónica. También recientemente se demostró que las neuronas TRHérgicas coexpresan el transportador vesicular de glutamato-2 (VGlu2) (27). Aunado a esto, la expresión diferencial de receptores adrenérgicos, GABAérgicos y glutamatérgicos en el NPV, sugiere la participación de mecanismos de neurotransmisión en la regulación de las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV (28-32).

Las neuronas TRHérgicas del NPV no solo son inervadas por neuronas que producen neurotransmisores, sino también por aquellas que sintetizan neuropéptidos. Se han caracterizado fenotípicamente aferencias provenientes del núcleo arcuato. Se ha demostrado que terminales inmunoreactivas a neuropéptido Y (NPY), una proteína relacionada con el péptido Agutí (AGRP), la hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH), CART y galanina establecen contactos sinápticos con las neuronas TRHérgicas del NPV (33-38).

### 13.2 Regulación de la biosíntesis de la TRH en las neuronas del NPV del hipotálamo.

Las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo de la rata modifican su actividad metabólica durante diferentes condiciones fisiológicas como son: la lactancia, el ciclo circádico y el ciclo estral (39-40) y en respuesta a diferentes condiciones farmacológicas y experimentales: alteraciones del estado tiroideo y adrenal, endotoxemia, privación de alimento y estrés por frío (41-46).

#### a) Regulación de la TRH por hormonas: tiroideas y glucocorticoides.

El hipotiroidismo en la rata induce un aumento tanto en la biosíntesis de la TRH en el NPV como en la liberación de la TRH de la eminencia media mientras que el efecto opuesto se observa en ratas hipertiroideas (41-42). El grupo del Dr. Lechan (47) demostró que la regulación negativa del RNAm de la TRH en el NPV por las hormonas tiroideas es tejido-específica y directa sobre las neuronas TRHérgicas. Consistente con este hallazgo, se ha demostrado que las neuronas TRHérgicas expresan varias de las isoformas del receptor para hormonas tiroideas (48). En estudios *in vivo* se ha observado que los glucocorticoides ejercen un efecto negativo sobre la biosíntesis del RNAm de la TRH en el NPV evidenciado por un aumento en el nivel del RNAm en el NPV del hipotálamo de ratas adrenalectomizadas y una disminución de éste posterior al tratamiento con dexametasona (glucocorticoide sintético) ó corticosterona (43). Sin embargo, en células hipotalámicas fetales en cultivo se ha demostrado que el efecto de dexametasona depende estrictamente de la dosis y el tiempo de exposición, observándose una reducción en el RNAm de la TRH a  $1 \times 10^{-10}$  M, mientras que entre  $1 \times 10^{-8}$  y  $1 \times 10^{-6}$  M aumenta el nivel de RNAm de la TRH después de 1-3 h de tratamiento (49). Estos datos sugieren que los glucocorticoides pudieran modular en forma diferencial la biosíntesis de la TRH. Se ha propuesto que, los glucocorticoides regulan la biosíntesis de la TRH específicamente en el NPV, esto apoyado por la coexpresión del RNAm de la TRH y los receptores para los glucocorticoides en el NPV (50). Sin embargo el efecto de la aplicación directa de glucocorticoides en el NPV sobre la expresión del RNAm de la TRH no ha sido estudiado.

### b) Regulación de la TRH por el factor neuronal derivado de cerebro (BDNF)

Hemos observado que las neuronas TRHérgicas del hipotálamo fetal y neonatal (1º o 2º día postnatal) en cultivo al ser incubadas con la neurotrofina BDNF se incrementa el nivel del RNAm de TRH y este aumento es dependiente de su receptor TrkB. Además las neuronas TRHérgicas expresan al receptor catalítico TrkB (51).

### c) Regulación de la TRH por neurotransmisores.

Estudios *in vivo* apoyan una acción noradrenérgica positiva sobre la biosíntesis basal de la TRH. Datos recientes del laboratorio (Uribe et al; en preparación) muestran que la aplicación intracerebroventricular de noradrenalina [2µg] en ratas macho aumenta en un 52% el nivel basal del RNAm de la TRH en el NPV 1h después de la inyección. *In vitro*, la aplicación de noradrenalina [1X10<sup>9</sup> M] al medio de cultivo de células fetales hipotálamicas causó un aumento en un 90% sobre los niveles de RNAm y liberación de la TRH 1h después de la incubación. El efecto estimulador noradrenérgico sobre el nivel del RNAm de la TRH fue bloqueado por la preincubación con antagonistas α o β adrenérgicos (52). Estos datos, así como estudios anatómicos mostrando la inervación noradrenérgica de las neuronas TRHérgicas del NPV sugieren la participación de la noradrenalina en la regulación de las neuronas TRHérgicas. Por otro lado se demostró que la aplicación de bicuculina, un antagonista para los receptores GABAérgicos tipo A en el NPV induce la expresión de la proteína c-Fos, un marcador ampliamente utilizado como un indicador de la activación neuronal. Esto se observó principalmente en la región parvocelular, zona en la que se localizan entre otros grupos neuronales peptidérgicos, las neuronas hipofisiotrópicas TRHérgicas (53). Además, la presencia de una densa red de axones GABAérgicos estableciendo contactos sinápticos con los somas y las dendritas de neuronas TRHérgicas del NPV demostrada mediante doble tinción: inmunocitoquímica para la enzima que sintetiza GABA (GAD) e hibridación *in situ* del preproTRH por el grupo del Dr. Lechan, provee una base anatómica para proponer al GABA como otro de los neurotransmisores implicados en la regulación de las neuronas TRHérgicas (26).

#### *d) Regulación de la TRH en respuesta al estrés*

##### *\*Deprivación de alimento o ayuno.*

La deprivación de alimento es una condición experimental en la rata, en la cual se activa el eje adrenal e inhibe el eje tiroideo reflejado por un incremento en el nivel de corticosterona circulante y una disminución en la concentración de hormonas tiroideas circulantes, que no correlaciona con una disminución del nivel de RNAm de la TRH en el NPV (45). La disminución del nivel de RNAm, parece ser modulada por varios factores extracelulares. Uno de los candidatos es la corticosterona debido a que se ha observado que el bloqueo de la respuesta en la corticosterona, restituye parcialmente el nivel del RNAm de la TRH en el NPV de ratas ayunadas, sugiriendo que los glucocorticoides podrían ser responsables de modular el nivel de RNAm de TRH en el NPV durante esta condición (54). Durante el ayuno, también se ha observado que la concentración circulante de leptina, una citosina liberada por el tejido adiposo disminuye como ocurre, con el RNAm de la TRH en el NPV. Restitución de los niveles basales de leptina en ratas deprivadas de alimento restituye el nivel del RNAm de TRH en el NPV (55). La posibilidad de que la leptina tenga un efecto directo en las neuronas TRHérgicas del NPV ha sido sugerida con base en que una población pequeña (8-13%) de neuronas TRHérgicas expresan receptores a leptina (56) y el mecanismo de señalización intracelular ocurre a través de la fosforilación de transductores de señal y activadores de la transcripción 3 (Stat3); sin embargo estos datos sugieren la participación de otras moléculas y no explican el efecto observado sobre la mayoría de las neuronas TRHérgicas durante el ayuno. Se ha demostrado varios blancos importantes de la leptina como son las neuronas del núcleo arcuato inmunoreactivas a: NPY, AGRP,  $\alpha$ -MSH, CART y galanina; las cuales contactan a las neuronas TRHérgicas del NPV. A este respecto se ha demostrado que varias aplicaciones intracerebroventriculares (ICV) durante tres días de NPY así como el AGRP inhibe la actividad biosintética de las neuronas TRHérgicas del NPV (57-58). La aplicación icv de  $\alpha$ -MSH o CART bloquea la disminución del nivel de RNAm de TRH en el NPV inducida por el ayuno (35 y 37). En resumen estas evidencias sugieren que las aferencias provenientes del núcleo arcuato juegan un papel importante en modular la actividad biosintética de las neuronas TRHérgicas del NPV durante el ayuno. Además, las neuronas TRHérgicas expresan al receptor MCR-4 para  $\alpha$ -MSH (56).

### *\*Endotoxemia.*

La endotoxemia inducida en la rata, ha sido estudiada como un modelo de reto inmunológico; en el cual se ha observado inhibición del eje tiroideo y activación del eje adrenal similar a lo que ocurre durante el ayuno. Sin embargo durante esta condición, los glucocorticoides no parecen ser los responsables de la inhibición del RNAm de TRH en el NPV inducido por la administración de los lipopolisacáridos (44). Debido a que los lipopolisacáridos provocan un incremento en la concentración de interleucinas tanto en la sangre como en el cerebro, se analizó el efecto de interleucina 1 $\beta$  humana, mediante su administración intracerebroventricular, observándose al igual que lo que ocurre con la administración de lipopolisacáridos una disminución en la expresión del RNAm de la TRH en el NPV, sugiriendo que ésta proteína podría ser la responsable de la inhibición sobre la expresión del gen de la TRH inducida por la administración de lipopolisacáridos (59). Durante la endotoxemia se ha observado también un incremento en la concentración sérica de leptina y en el núcleo arcuato un aumento en la expresión de los genes POMC y CART, péptidos que estimulan la expresión de la TRH pero sin cambio significativo en la expresión de neuropéptido Y, péptido inhibidor de la TRH, dichos cambios no correlacionan con la inhibición del eje HPT y en particular con el RNAm de la TRH en el NPV, sugiriendo la participación de moléculas diferentes en la regulación de las neuronas TRHérgicas del NPV de aquellas que participan durante el ayuno. El corte de las vías ascendentes del tronco cerebral no modifican la inhibición del eje tiroideo observado durante la endotoxemia (60).

### *\*Inmovilización.*

La inmovilización de animales, se ha utilizado como un modelo de estrés en el cual al igual que en la deprivación del alimento el eje tiroideo se encuentra inhibido, indicado por una disminución en los niveles circulantes de tirotrópina y hormonas tiroideas. Durante esta condición se ha observado también una reducción en la expresión del RNA m de TRH en el NPV 2h después de someter los animales a este tipo de estrés (61).

### *\*Exposición al frío.*

Por otro lado, se ha demostrado que la exposición a 4°C durante una hora induce un incremento rápido en el nivel del RNAm de la TRH en el NPV del hipotálamo de rata (46 y 62). Este incremento coincide con un aumento en la liberación de la TRH de la eminencia

media así como con un incremento en el nivel circulante de TSH y hormonas tiroideas (63-64). Otro grupo demostró que la perfusión de la eminencia media con un antagonista  $\alpha$  noradrenérgico (prazosin) fue capaz de inhibir el aumento en la liberación de la TRH inducida por la exposición al frío (65).

En resumen, podemos decir que la biosíntesis de la TRH en el NPV del hipotálamo es regulada por una variedad de factores extracelulares químicamente diferentes; sin embargo aún no se ha logrado definir cual o cuales son las señales extracelulares que juegan un papel determinante en modular la actividad de las neuronas TRHérgicas en una condición fisiológica determinada.

#### *1.4 ÁCIDO $\gamma$ -AMINO BUTÍRICO (GABA)*

El GABA es un neurotransmisor inhibitorio ampliamente distribuido tanto en el cerebro como en órganos periféricos. Dentro del cerebro se calcula que del 30-50% de todas las sinápsis son de tipo GABAérgico (66). El GABA es sintetizado en vesículas a partir de L-glutámico a través de una reacción de descarboxilación, la enzima responsable de esta reacción es la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) con fosfato de piridoxal como cofactor mientras que su degradación es iniciada mediante una reacción de transaminación, generando semialdehído succínico; la enzima responsable de esta reacción es la 4-aminobutirato-2-oxoglutarato aminotransferasa (GABA-T). El semialdehído succínico es entonces oxidado por la deshidrogenasa de semialdehído succínico (SSADH), generando ácido succínico, el cual entra entonces al ciclo de Krebs. Sin embargo en el cerebro la recaptura por transportadores de GABA es el mecanismo principal de inactivación (67).

Durante la despolarización de los axones GABAérgicos, el GABA es liberado de vesículas sinápticas hacia el espacio sináptico. Después de alcanzar el espacio sináptico, el GABA se une a receptores específicos localizados en la membrana postsináptica. Hasta el momento se han descrito tres tipos de receptores GABAérgicos: GABA-A y GABA-C; los cuales son canales de  $\text{Cl}^-$  y los receptores GABA-B que están acoplados a proteínas G. La apertura del canal de  $\text{Cl}^-$  causa un incremento en la conductancia de  $\text{Cl}^-$  en la membrana presináptica y/o postsináptica, aumentando en la mayoría de los casos un influjo de  $\text{Cl}^-$  hasta que el potencial de equilibrio sea alcanzado. Lo contrario ocurre en casos menos frecuentes; en los cuales el potencial de membrana es mas negativo que el potencial de equilibrio de  $\text{Cl}^-$ . Independientemente de la dirección del flujo de  $\text{Cl}^-$ , el cambio en la conductividad de la

membrana sináptica causada por el GABA reducirá la efectividad de la conductancia excitatoria de  $\text{Na}^+$  en la disminución del potencial de membrana. De manera que el GABA siempre ejercerá un efecto inhibitorio, ya sea que el potencial presináptico y/o postsináptico que este genere sea despolarizante o hiperpolarizante (68). Los receptores GABA-B producen señales inhibitorias lentas y prolongadas que funcionan para modular la liberación del neurotransmisor, es decir, funcionan principalmente como autoreceptores; sin embargo también se ha demostrado su acción en sitios postsinápticos (69-70). La unión de GABA a receptores GABA-B, conduce a la activación de sistemas de segundos mensajeros como fosfolipasa C o adenilato ciclasa así como a la activación de canales iónicos de  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  (71).

#### *1.4.1 Receptores GABA-A.*

Los receptores de GABA tipo A son canales de  $\text{Cl}^-$  dependientes de ligando (Fig. 2a). Estudios de biología molecular han mostrado que estos receptores están compuestos por cinco subunidades; las cuales pertenecen a diferentes clases. Hasta el momento se han clonado del sistema nervioso de mamíferos varias isoformas para cada subunidad:  $6\alpha$ ,  $4\beta$ ,  $3\gamma$ ,  $1\delta$ ,  $1\epsilon$ ,  $1\pi$ ,  $1\theta$  y  $3\rho$  y dependiendo de la combinación de las subunidades, los receptores exhiben propiedades electrofisiológicas y farmacológicas específicas (72). Mediante el uso de inmunodepleción se mostró que la mayoría de los receptores GABA-A están compuestos por dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una  $\gamma$ , en menor proporción se encontraron las combinaciones:  $\alpha\beta\delta$ ,  $\alpha\beta\epsilon$ ,  $\alpha\beta\pi$ ,  $\alpha\beta\rho$ . Cabe mencionar que en la subunidad  $\beta$  se localiza el sitio de unión para GABA (73). Además una variedad de drogas farmacológicamente importantes como: benzodiazepinas, barbitúricos, esteroides, anestésicos y convulsivos producen parte de sus efectos clínicos mediante su interacción con diferentes sitios de unión alostéricos en los receptores de GABA tipo A (74) y debido a ello su función puede ser aumentada o reducida mediante la unión de diferentes moduladores en sitios específicos del receptor, resultando en el SNC estados que van desde sedación severa como la pérdida de la conciencia hasta la excitación extrema con la aparición de convulsiones (75-76). Además de la regulación alostérica mediada por drogas, la expresión del RNAm de las subunidades ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) del receptor de GABA tipo A es regulada diferencialmente durante el desarrollo (77-78). Estudios en animales adultos proveen evidencia también para una regulación región y subunidad específica del nivel de RNAm de algunas de las subunidades del receptor de GABA tipo A en respuesta a un aumento en la concentración cerebral de GABA inducido por

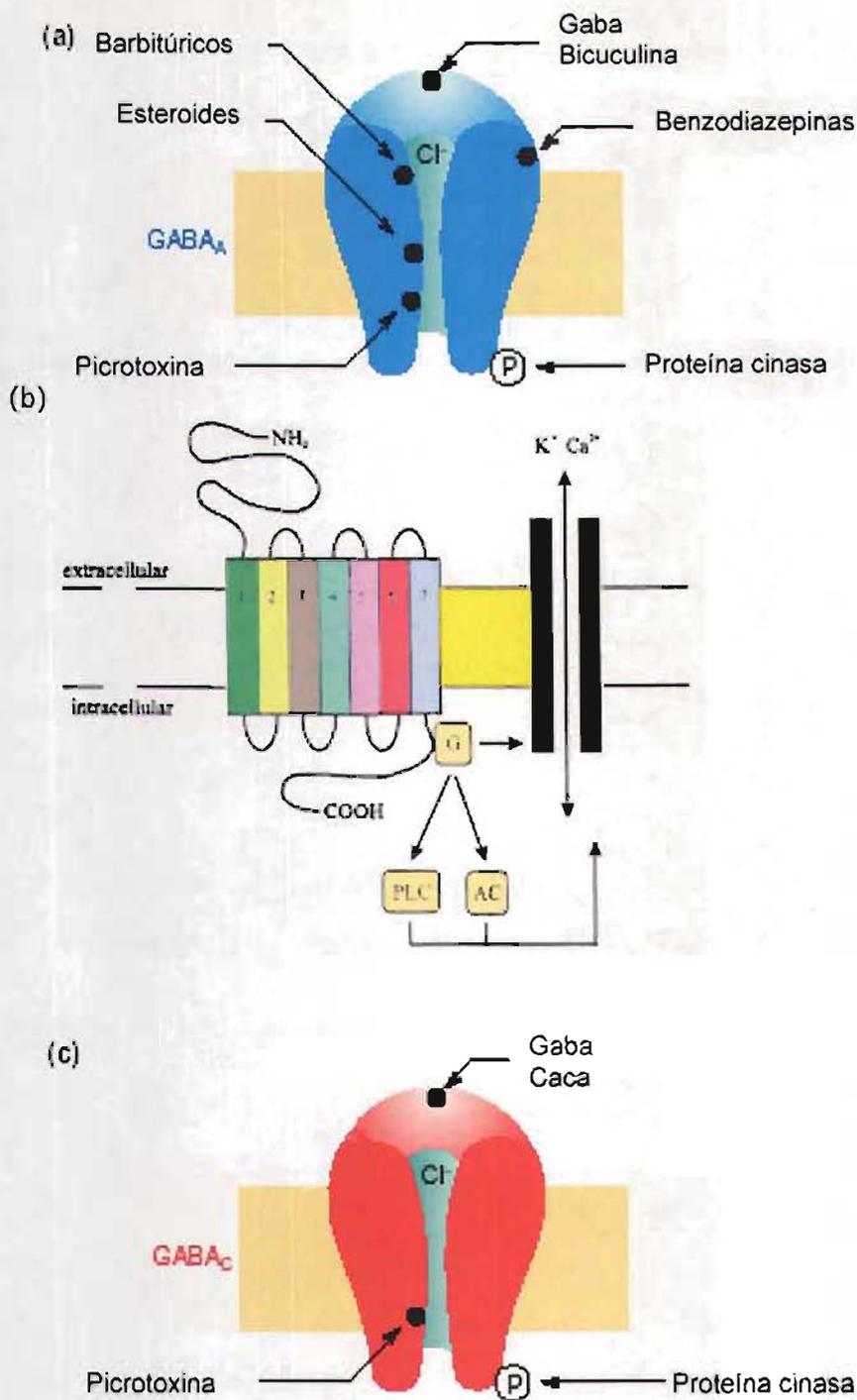
el tratamiento con un inhibidor de GABA-T (79). Estos datos sugieren que la expresión de los receptores de GABA tipo A en la rata puede ser regulada durante la ontogenia, así como en estado adulto. La farmacología así como su distribución dentro del sistema nervioso central de la rata se muestra en la tabla 1.

#### 1.4.2. Receptores GABA-B

Hasta el momento se han clonado tres subunidades: GABA-BR1a, GABA-BR1b y GABA-BR2 (Fig. 2b). Estudios de doble inmunoprecipitación han mostrado que existen combinaciones de estas subunidades *in vivo* en forma de dímeros o multímeros (80). Por otro lado, estudios de inmunohistoquímica han mostrado una distribución muy amplia de los receptores de GABA tipo B dentro del SNC de la rata (81). Recientemente se ha demostrado su presencia en células secretorias de la pituitaria anterior (82). La farmacología así como su distribución se muestran en la tabla 1.

#### 1.4.3 Receptores GABA-C

Los receptores de GABA tipo C, son canales de Cl<sup>-</sup> fisiológica y farmacológicamente diferentes a los receptores GABA-A. Se describieron en varias subpoblaciones celulares de la retina de mamíferos, donde se encuentran altamente enriquecidos (83). Recientemente se encontraron en los tirotopos de la pituitaria anterior (84). Hasta la fecha, en mamíferos se han clonado tres subunidades ( $\rho_1$ ,  $\rho_2$  y  $\rho_3$ ); las cuales pueden ensamblarse como homooligómeros o heterooligómeros en sitios postsinápticos de células bipolares de la retina. Las subunidades  $\rho$  comparten del 30-38% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\rho$  de los receptores GABA-A. Hasta el momento no hay evidencia de que las subunidades  $\rho$  se asocien con la subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$  de los receptores tipo A. Los genes de la subunidad  $\rho_1$  y  $\rho_2$  se localizan juntos en el cromosoma seis y cuatro del genoma de humano y de ratón respectivamente (85). Los receptores GABA-C son activados selectivamente por análogos del GABA conformacionalmente restringidos del (tabla 1). Estos receptores no responden a bicuculina (antagonista tipo A) ni a baclofen (agonista tipo B) y son también insensibles a los moduladores alostéricos de los receptores GABA-A como las benzodiazepinas, los barbitúricos y los esteroides (Fig. 2c) (86).



**Fig. 2. Representación de los receptores ionotrópicos y metabotrópicos de GABA.** a) Los receptores GABA-A son canales de Cl<sup>-</sup> con sitios de unión alostéricos para benzodiazepinas, barbitúricos y esteroides. Las respuestas de GABA son bloqueadas competitivamente por bicuculina y no-competitivamente por picrotoxina. b) Los receptores GABA-B pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), cada subunidad contiene cuatro dominios transmembranales (TM1-TM4), una asa intracelular

entre TM3 y TM4 contiene sitios consenso para fosforilación por proteínas cinasas. c) Los receptores GABA-C son también canales de Cl<sup>-</sup>, su topología se asume que es similar a los receptores GABA-A; sin embargo los receptores GABA-C están compuestos exclusivamente por subunidades  $\rho$  (1-3) (86).

RECEPTOR	AGONISTAS	ANTAGONISTAS	DISTRIBUCIÓN
GABAR-A	muscimol ppa apsa	bicuculina isoguvacina thip picrotoxin <b>triazolopiridazinas*</b> <b>imidazopiridinas*</b> <b>barbitúricos*</b> <b>esteroides*</b>	bulbo olfatorio, corteza, hipocampo, amígdala, septum, hipotálamo (núcleos: paraventricular, dorsomedial, ventromedial y arcuato), área preóptica tálamo, cerebelo, tronco cerebral y médula espinal.
GABAR-B	baclofen ácido fosfónico	faclofen saclofen ácido sulfónico	bulbo olfatorio, corteza, hipocampo, septum, ganglios basales, amígdala, tálamo e hipotálamo (supraquiasmático, supraóptico, paraventricular, arcuato, dorsomedial y ventromedial), área preóptica, cerebro medio, cerebelo y médula espinal.
GABAR-C	taca caca tamp camp	picrotoxin (parcial) I4aa tpmpa	retina y pituitaria anterior.

**Tabla 1. Farmacología y Distribución en el cerebro de rata de los receptores de GABA.** Abreviaturas: ppa; ácido piperidino-4-sulfónico, apsa; ácido 3-aminopropano-sulfónico, taca; ácido trans-4-aminocrotónico, caca; ácido cis-4-aminocrotónico, tamp; ácido carboxílico-trans-2-aminometil-ciclopropano, camp; ácido carboxílico-cis-2-aminometil-ciclopropano, thip; ácido 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo (5, 4-c) 3-ol-piridina, I4aa; ácido imidazol-4 acético; tpmpa; ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridina-4-il-metilfosfónico. \*: **moduladores.**

## 1.5 PARTICIPACIÓN DEL GABA EN EL CONTROL NEUROENDÓCRINO (NPV-PITUITARIA)

El GABA ha sido identificado como uno de los neurotransmisores reguladores de los ejes neuroendócrinos. Uno de ellos es el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA); el cual responde a cambios ambientales secretando corticosteroides hacia la circulación sistémica y debido a ello es que representa uno de los mecanismos principales de adaptación en los organismos vertebrados (87).

Varios reportes apoyan una acción GABAérgica inhibitoria sobre el eje HPA. En efecto, la microinyección de bicuculina (antagonista GABAR-A) en el NPV derecho aumenta la expresión del RNAhn de la CRH y la AVP 1 h después de la aplicación. La aplicación de bicuculina también aumenta la expresión de la proteína c-Fos en el NPV, un indicador de activación neuronal, sugiriendo la existencia de un tono GABAérgico inhibitorio sobre la actividad transcripcional de las neuronas CRHérgicas y vasopresinérgicas en el NPV (53). Consistente con lo previamente reportado, se demostró que la bicuculina *in vitro* es capaz de inducir un incremento en la expresión de CRH y AVP así como la inducción de la proteína c-Fos en el NPV de rebanadas hipotálamicas en cultivo; sin embargo la aplicación de bicuculina directa en el NPV derecho sólo aumentó la expresión del RNAhn de AVP (88). En conjunto, estos datos apoyan la existencia de un tono GABAérgico inhibitorio restringiendo la transcripción génica de la CRH y la vasopresina

No solo la actividad transcripcional de las neuronas CRHérgicas en el NPV es regulada por el GABA sino también hay evidencias de su participación en la actividad secretoria. Utilizando explantes de tejido en cultivo, se demostró que la aplicación de bicuculina [40µM] al medio de cultivo induce un incremento de 4 veces en la liberación de la CRH, mientras que ninguno de los agonistas glutamatérgicos (NMDA, AMPA O KAINATO) afectaron la secreción de la CRH; sin embargo la coaplicación de CNQX [20µM] (antagonista AMPA/KAINATO) fue capaz de impedir el aumento en la secreción de CRH inducida por bicuculina. Estos datos sugieren que la secreción de la CRH también puede ser regulada negativamente por el GABA a través de su receptor tipo A (89). Aunado a esto se han demostrado conexiones sinápticas entre neuronas CRHérgicas y terminales nerviosas GABAérgicas y mediante hibridación *in situ* doble, se ha demostrado que la mayoría de las neuronas CRHérgicas del NPV expresan transcritos de las subunidades ( $\alpha$ 1-2 y  $\beta$ 1-3) del

receptor GABA-A (90-91). En conjunto estas evidencias apoyan una acción GABAérgica inhibitoria tanto en la biosíntesis como en la secreción de la CRH.

Se ha propuesto también la participación del GABA en los mecanismos de inhibición que ocurren durante la activación del eje HPA inducida por estrés (92-96). A este respecto, se ha demostrado que la microinyección de muscimol (agonista GABA-A) en el NPV previo a la exposición de las ratas a éter es capaz de reducir el número de células positivas a la proteína c-Fos en el NPV e inhibir la respuesta en corticosterona (92). Durante la exposición de animales a éter se observa que el nivel de expresión del CRN en el NPV inicia de un nivel bajo y después de un pico rápido máximo, llega a un nivel mas bajo que la transcripción basal, este efecto es independiente de los glucocorticoides, ya que animales adrenalectomizados con o sin restitución constante de corticosteroides mostraron esta "sobre-inhibición", implicando a otras moléculas en la modulación de la inhibición observada durante esta condición.

Además del GABA, el óxido nítrico ha sido implicado en la regulación de la actividad del eje HPA. Givalois y colaboradores (97) demostraron que la aplicación intracerebroventricular de HP-228 (inhibidor de la sintasa de óxido nítrico, iNOS) [4µg/Kg], aumentó el nivel del RNAm de CRH en el NPV y la concentración de ACTH en suero 4h y 30 min después de la aplicación respectivamente. La modulación de la actividad neuronal mediada por óxido nítrico se sabe que puede ocurrir a través de dos mecanismos generales diferentes:

- a) Directo, modulando la conductancia de membranas postsinápticas presentes en neuronas eferentes.
- b) Indirecto, modulando aferencias de neuronas del NPV, posiblemente involucrando neurotransmisores. Uno de los candidatos es el GABA, ya que éste neurotransmisor es liberado por óxido nítrico a través de incremento en el contenido intracelular de monofosfato de guanosina (GMPc) estimulando a proteínas cinasas G (98). Por otro lado, se ha mostrado que la inhibición de la actividad simpática inducida por óxido nítrico en el NPV es bloqueada por la microinyección de bicuculina en dicho núcleo (99). Con base en estos resultados, se ha propuesto que la regulación negativa del óxido nítrico sobre la actividad nerviosa simpática dentro del NPV esta mediada por el GABA (100).

Al igual que con la regulación del eje adrenal, el GABA ha sido implicado en la regulación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) debido a que se han observado cambios en la concentración sérica de TSH en respuesta a la administración de GABA.

En cuanto al papel del GABA en la secreción de TSH de la pituitaria anterior. Mattila y col (101) observaron que la inyección intraperitoneal de muscimol [0.5mg/Kg] (agonista GABAR-A) en ratas macho, aumentó significativamente el nivel basal de TSH en suero, mientras que la inyección de bicuculina [2mg/Kg] disminuyó 60 min después de la aplicación. Al igual que la bicuculina, la aplicación de baclofen [10mg/Kg] (agonista GABAR-B) disminuyó la concentración sérica de TSH. El efecto máximo de baclofen se observó a las 2h pero los niveles de TSH bajos se mantuvieron hasta 4h después de aplicación. En este estudio se analizó también el papel del GABA en la respuesta de TSH inducida por la exposición al frío; la cual se conoce que esta mediada por la TRH del NPV. En esta condición se observó que la aplicación periférica de GABA [500mg/Kg], muscimol [2mg/Kg] o baclofen [5mg/Kg] bloqueó la secreción de TSH inducida por la exposición al frío. A diferencia de lo observado en condiciones basales, la aplicación de bicuculina en condiciones estimuladas no afectó el nivel de TSH con cualquiera de las dosis utilizadas [0.5, 1, 2 y 4 mg/Kg]. La inyección de GABA [5µg/animal] en el hipotálamo medio basal también inhibió la respuesta de TSH inducida por el frío; sin embargo la aplicación de GABA en el tercer ventrículo no tuvo efecto. Posteriormente este mismo grupo de trabajo, analizó el efecto de picrotoxina, (antagonista GABAR-A) pero con diferente sitio de unión al de la bicuculina y además analizó el efecto de antagonistas para los receptores de noradrenalina, serotonina y dopamina (phenoxybenzamine, ciproheptadina y pimozide respectivamente), encontrándose que ninguna de las drogas inyectadas a la periferia contrarrestaron la inhibición de la respuesta de TSH al frío causada por muscimol (102). Por otro lado y de acuerdo a lo observado con las inyecciones periféricas, se demostró que la inyección en el tercer ventrículo de varias dosis de GABA (0.5-5µm) disminuye significativamente el nivel basal de TSH en suero de ratas macho. Dicho efecto inhibitorio fue observado desde los 10 min manteniéndose hasta 60min después de la aplicación. Similar a lo observado por Mattila y col, la aplicación de picrotoxin (1µm) en el tercer ventrículo no modificó la concentración sérica de TSH en ratas macho; sin embargo el pretratamiento con picrotoxin fue capaz de impedir el efecto inhibitorio de GABA (103). En otro estudio similar al descrito previamente se observó una disminución dosis-dependiente de GABA sobre el nivel sérico de TSH en ratas

macho; la cual fue bloqueada por la aplicación de bicuculina (104). En este estudio se determinó además el contenido celular de la noradrenalina y la dopamina en el hipotálamo medio basal (área preóptica-supraquiasmática), la eminencia media y pituitaria anterior. Encontrándose que el contenido celular de la noradrenalina no se modificó en el hipotálamo medio basal por la aplicación de GABA en el tercer ventrículo; sin embargo aumentó de manera rápida (5min) y transitoria la concentración de noradrenalina en la eminencia media. En cuanto a la dopamina tampoco se observaron cambios en el contenido celular en el hipotálamo medio basal mientras que en la eminencia media se observó un aumento a los 5 min determinándose un pico a los 15min después de la aplicación intraventricular de GABA. Al igual que en la eminencia media, el GABA incrementó el contenido celular de dopamina en la pituitaria anterior 15min después de su aplicación. En base a los resultados previamente descritos, se propone que la acción inhibitoria de GABA sobre la TSH podría ocurrir a través de dopamina, a nivel de la eminencia media, esto apoyado también por el hecho de que la aplicación de un antagonista dopaminérgico (pimozide) es capaz de bloquear el efecto inhibitorio de GABA sobre la concentración de TSH en suero. En contraste con lo observado en las inyecciones periférica y en el tercer ventrículo, otros autores no encontraron cambios en el nivel de TSH en machos ni en hembras después de la aplicación de 5 y 10 $\mu$ m de GABA en el ventrículo lateral 15min después de su aplicación (105). Si bien estos datos sugieren una acción GABAérgica inhibitoria sobre la regulación del eje tiroideo, hasta el momento la acción de GABA sobre las neuronas TRHérgicas así como en la concentración de hormonas tiroideas no ha sido descrita aun cuando se ha demostrado la existencia de conexiones sinápticas entre terminales nerviosas GABAérgicas con los somas y las dendritas de las neuronas TRHérgicas en el NPV y la activación de un número importante de neuronas parvocelulares en respuesta a la microinyección de bicuculina ( 26 y 53).

**II HIPÓTESIS:** Con base en la distribución anatómica de las terminales nerviosas inmunoreactivas a GABA, proponemos que este neurotransmisor regula la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina en el NPV del hipotálamo de la rata.

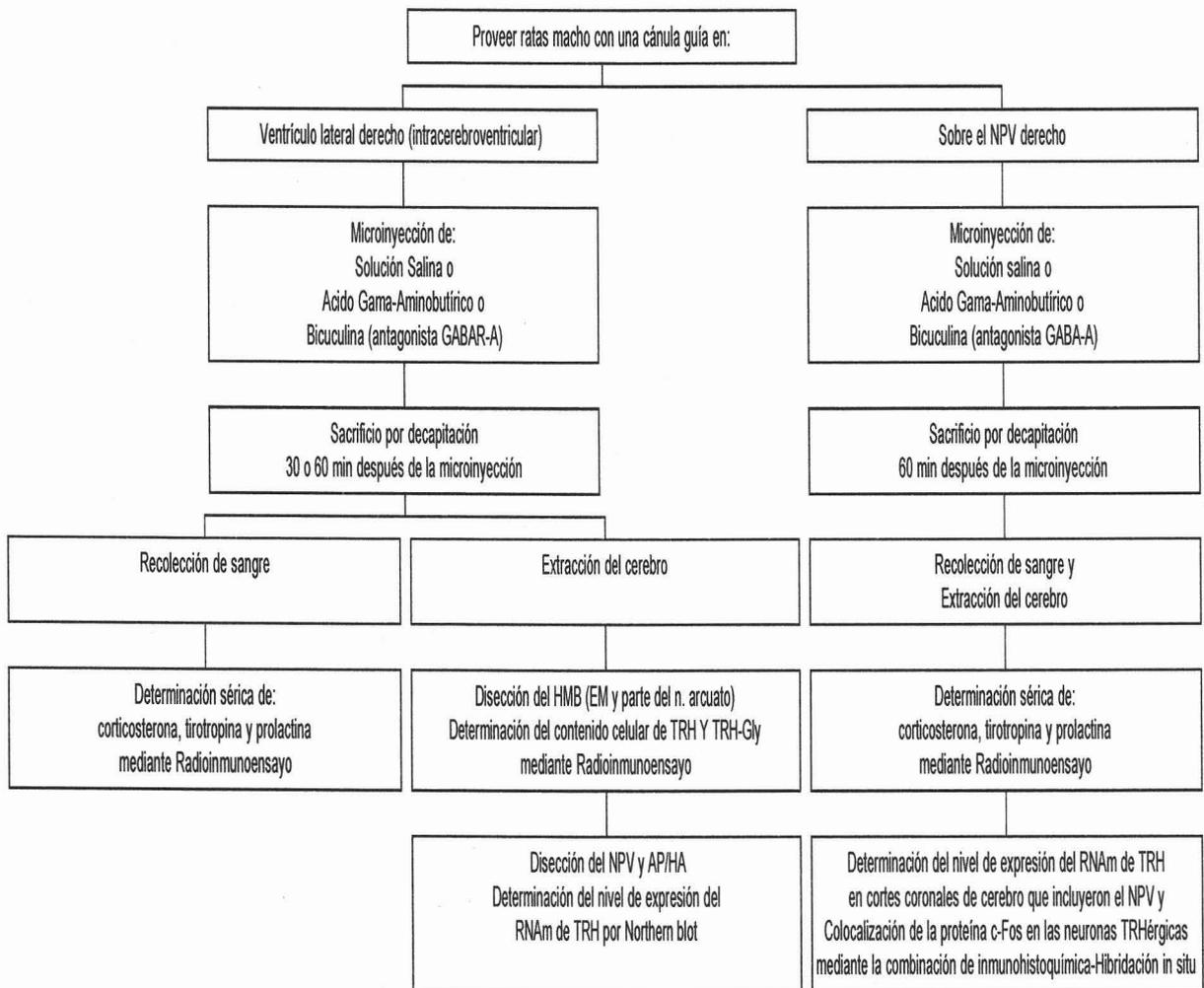
**III OBJETIVO:**

**GENERAL:** Definir la participación de la transmisión GABAérgica en la regulación de la biosíntesis de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el NPV del hipotálamo de la rata.

**PARTICULARES:**

- 1.- Determinar si el GABA modula el nivel basal del RNAm de TRH en el NPV del hipotálamo.
- 2.- Definir si el bloqueo de la transmisión GABAérgica activa a las neuronas TRHérgicas, utilizando como indicador la expresión de la proteína c-Fos.

## IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL:



## V. MATERIALES Y MÉTODOS:

### V. 1 ANIMALES:

Se utilizaron ratas machos adultos de la cepa Wistar, los cuales fueron mantenidos en condiciones controladas de luz-oscuridad (ciclo de 12-12 h), agua y alimento *ad libitum*. Bajo anestesia, se realizó la implantación de una cánula guía en dos regiones diferentes del cerebro: a) en el ventrículo lateral derecho (intracerebroventricular) (Plastics-One, C312G-21GA) y b) sobre el NPV derecho del hipotálamo de la rata (Plastics-One, C316G-24GA).

A) Para la implantación intracerebroventricular se utilizaron animales cuyo peso osciló entre 300 y 350 g. Previo a la cirugía, los animales fueron anestesiados utilizando ketamina (100mg/Kg) y xilazina (10mg/Kg) vía intramuscular. Posteriormente la cabeza de cada animal se fijó en un aparato estereotáxico (MD-3000, Bioanalytical Instruments), introduciendo en ángulo recto una barra en cada uno de los oídos y fijando en el mismo plano los dientes a un soporte para los incisivos. Posteriormente se realizó un corte de piel a lo largo de la cabeza para dejar al descubierto el cráneo, se eliminó el tejido presente sobre el cráneo y se limpió para localizar el bregma, con respecto al cual fueron localizadas las regiones de interés de acuerdo al Atlas Paxinos (106). Para las implantaciones ICV las coordenadas utilizadas fueron las siguientes: lateral (-1.5 mm), anterior-posterior (-0.3 mm) con respecto al bregma, y dorso-ventral (-4.5 mm) con respecto al cráneo. Una vez definida la posición del ventrículo lateral, en el cráneo se procedió a realizar un orificio pequeño a través del cual se introdujo la cánula guía. La cánula se fijó al cráneo con tres minitornillos y cemento dental. La cánula fue temporalmente ocluida con una tapa. Después de la cirugía los animales se mantuvieron en cajas individuales por siete días; durante los cuales se manipularon diariamente.

Los animales despiertos, provistos con una cánula guía en el ventrículo lateral derecho fueron inyectados con 4 $\mu$ l (1 $\mu$ l/min) de solución salina libre de pirógenos o GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid, sigma, cat#: A5835) [5 $\mu$ m] o bicuculina (Bicuculline-methiodide, sigma, cat#: B6889) [250pm o 500pm], el antagonista para los receptores de GABA tipo-A. Treinta o sesenta minutos después de la inyección los animales fueron sacrificados por decapitación e inmediatamente se colectó sangre del tronco y disecó de cada animal; el hipotálamo medio basal (HMB) compuesto por la eminencia media y parte del núcleo arcuato, el resto del cerebro fue congelado y mantenido a -70°C hasta su procesamiento. La verificación de la

posición de la cánula se realizó en el momento de la disección de las regiones de interés, los animales en los cuales se observó a nivel del ventrículo lateral derecho una lesión causada por la introducción de la cánula se incluyeron en el análisis, mientras que todos aquellos animales en los cuales no se observó lesión o se observó hemorragia fueron eliminados del estudio.

B) En la implantación sobre el NPV derecho se emplearon animales cuyo peso osciló entre 250 y 300g debido a que encontramos que este rango de peso fue el óptimo para esta implantación obteniendo un porcentaje de certeza del 30-40%. Las coordenadas utilizadas fueron las siguientes: lat (-0.4mm), a/p (-1.35mm) con respecto al bregma y dorsoventral (-7.4mm) con respecto al cráneo. Una vez definida la posición del NPV derecho, en el cráneo se procedió a realizar cuidadosamente un orificio pequeño para evitar romper la vena sinus; la cual fue retraída en el momento de la introducción de la cánula. La cánula se fijó al cráneo con tres minitornillos y cemento dental. La cánula se ocluyó temporalmente con una tapa. Después de la cirugía los animales se mantuvieron en cajas individuales por siete días; durante los cuales se manipularon diariamente.

Posteriormente los animales se inyectaron con 2 $\mu$ l (0.5 $\mu$ l/min) de solución salina o GABA [0.5 $\mu$ M] o bicuculina [100pm]. Sesenta minutos después de la microinyección los animales se sacrificaron por decapitación e inmediatamente se colectó sangre del tronco y se obtuvo el cerebro; el cual se congeló y mantuvo a -70°C hasta su procesamiento.

## *V. 2 EXTRACCIÓN DE TRH DEL HIPOTÁLAMO MEDIO BASAL (HMB).*

Las muestras de HMB se sonicaron en 300 $\mu$ l de ácido acético al 20%; de esta mezcla se tomó una alícuota de 240 $\mu$ l para determinar la concentración de TRH inmunoreactivo (TRHir) en el homogenizado y el resto se guardó a -20°C para determinar la concentración de proteína. Las alícuotas de 240 $\mu$ l se evaporaron a sequedad y posteriormente a la pastilla se le adicionó 1ml de metanol al 90% para extraer el péptido. Los tubos se guardaron toda la noche a -20°C. Al día siguiente los tubos se centrifugaron (11000g/15min) y se pasó el metanol a otro tubo limpio. Posteriormente el metanol se evaporó a sequedad. Para la determinación de la concentración del péptido, las muestras fueron resuspendidas en un volumen de 330 $\mu$ l de buffer de radioinmunoensayo amortiguador de fosfatos (fosfato de sodio 50mM, cloruro de sodio 150mM y albúmina 0.25%, pH 7.5). La determinación de la concentración del péptido se realizó en 50 $\mu$ l del extracto.

### *V. 3 Radioinmunoensayo (RIA) del péptido TRH en el HMB y corticosterona, tirotropina y prolactina en suero.*

La descripción de la preparación de cada ensayo esta en la tabla 2. En cada uno de los ensayos se realizaron controles: CPMs totales, unión no específica (NSB) y unión en ausencia de hormona fría (B0).

Una curva estándar por triplicado que consistió en: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de TRH, TSH o PRL en 100 µl de buffer RIA y en buffer diluyente de esteroides (fosfato de sodio 10mM, pH 7.5, cloruro de sodio 150mM y gelatina 0.1 %) para el caso de corticosterona. Las muestras problema se analizaron por duplicado.

Una vez agregado la hormona marcada y el anticuerpo las muestras se incubaron a temperatura ambiente (TSH y PRL) o a 4°C (TRH y corticosterona) de 24-48h. Posteriormente el complejo antígeno-anticuerpo se precipitó agregando 1ml de etanol absoluto frío (TRH) o 200µl de carbón dextrán (corticosterona) o 100µl de anticuerpo anti-IgG de conejo (1:40), 100µl de suero normal de conejo (2%) y 1ml de polietilenglicol 4% (TSH) o 100µl de  $\gamma$ -globulina bovina 0.5% y 500µl de polietilenglicol 20% (PRL) y por centrifugación 1700g/30min. Finalmente se aspiró el sobrenadante y el complejo antígeno-anticuerpo precipitado de cada muestra se cuantificó en un contador gamma (LKB-Wallac, 1275) para el caso de la TRH, la TSH y la PRL o en un contador beta (LS-60001C, Beckman) para el caso de la corticosterona.

### *V.4 Determinación de la concentración del péptido TRH y hormonas: corticosterona, tirotropina y prolactina en la muestra medidos por RIA.*

El cálculo de la concentración del péptido o hormona en la muestra problema se realizó en un programa de cómputo; el cual realiza una regresión lineal de dosis respuesta, en la que relaciona el logaritmo de la dosis y el logit de B/Bo; donde B es la radioactividad enlazada al anticuerpo y Bo es la radioactividad enlazada al anticuerpo en ausencia de hormona fría. En esta relación  $\text{logit } B/Bo = \ln (B/Bo / 1 - B/Bo)$ . Cuando los datos de cpm y dosis de la curva estándar se alimentan al programa se obtiene una línea recta, en la cual se realiza una interpolación de los valores de cpm de las muestras problema para calcular la concentración de la hormona.

<b>Radioinmuno-ensayo</b>	<b>CPMs totales</b>	<b>NSB</b> (Unión no específica)	<b>B0</b> (Unión en ausencia de hormona fría)	<b>Muestras problema</b>
Hormona Liberadora de Tirotropina-ir (TRH)	100µl TRH-I <sup>125</sup> (5000 cpm)	100µl TRH-I <sup>125</sup> 200µl buffer RIA	100µl TRH-I <sup>125</sup> 100µl buffer RIA 100µl Anticuerpo anti TRH (1:10,000)	50µl de extracto 100µl TRH-I <sup>125</sup> 100µl Anticuerpo anti TRH (1:10,000)
Corticosterona-ir (B)	100µl B-H <sup>3</sup> (10,000 cpm)	100µl B-H <sup>3</sup> 600µl buffer RIA	100µl B-H <sup>3</sup> 500µl buffer RIA 100µl Anticuerpo anti B (1:1200)	500µl suero (1:500) desnat a 98°C/10min 100 µl B-H <sup>3</sup> 100µl Anticuerpo anti B (1:1200)
Tirotropina-ir (TSH)	100µl TSH-I <sup>125</sup> (10,000 cpm)	100µl TSH-I <sup>125</sup> 300µl buffer RIA	100µl TSH-I <sup>125</sup> 200µl buffer RIA 100 µl Anticuerpo anti TSH (1:375,000)	50µl suero 100µl Anticuerpo anti TSH (1:375,000) 100µl TSH-I <sup>125</sup>
Prolactina-ir (PRL)	100µl PRL-I <sup>125</sup> (10,000 cpm)	100µl PRL-I <sup>125</sup> 300µl buffer RIA	100µl PRL-I <sup>125</sup> 200µl buffer RIA 100 µl Anticuerpo anti PRL (1:105,000)	50µl suero 100µl Anticuerpo anti PRL (1:105,000) 100 µl PRL-I <sup>125</sup>

Tabla 2. Descripción de la preparación de los diferentes Radioinmunoensayos.

### V. 5 Disección del Núcleo Paraventricular (NPV) y área Preóptica/Hipotálamo Anterior (AP/HA)

Sobre una caja petri se colocó un cerebro congelado sin HMB, se dejó pasar un min aproximadamente para que se descongelara un poco, con una navaja tipo Gillette se realizó un primer corte transversal donde los nervios ópticos empiezan a abrirse, se obtuvieron dos rebanadas de aproximadamente 1.5 mm de grosor, la primera de la parte anterior al primer corte de donde se obtuvo el tejido que incluyó el área preóptica y la segunda de la parte posterior al primer corte, de esta última se extrajo el tejido que incluyó al NPV (107). Para disecar el área preóptica se localizó el quiasma óptico; el cual se observa como una pequeña franja transversal de color blanco en la rebanada y el tercer ventrículo como una pequeña división en la parte inferior de la rebanada. Con un micro sacabocados de (2mm de diámetro) se perforó la rebanada entre el quiasma y a cada lado del tercer ventrículo, se tomó el tejido

que incluyó al área preóptica. Para realizar la disección del NPV se localizó el tercer ventrículo, que se observa como una pequeña división en la parte inferior de la rebanada y los fornices que se observan como dos pequeños puntos blancos en la parte superior y al lado derecho e izquierdo del tercer ventrículo. Con un micro sacabocados de (2mm de diámetro) se perfora la rebanada entre los dos fornix y el tercer ventrículo y se tomó el tejido correspondiente al núcleo paraventricular.

Los tejidos se mantuvieron congelados a -70°C hasta realizar la extracción del RNA total

## *V. 6 Extracción de RNA total*

La purificación del RNA total se realizó siguiendo el método de Chomczynski (108). Los tejidos fueron homogenizados en 400µl (NPV) ó 600µl (AP/HA) de solución D (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 25mM y sarcocil 0.5%) con β-mercaptoetanol (350µl/50ml de sol D). Al homogenizado se le agregó un décimo del volumen de acetato de sodio 2M, 400µl de fenol y 80µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) (NPV) o 600µl de fenol saturado con agua y 150 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (AP/HA), posteriormente se centrifugaron los tubos a 4°C y a 10000g/15min. Después se realizó una extracción con un volumen de fenol y un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico. Para precipitar los ácidos nucleicos, se agregó a la fase acuosa dos volúmenes de etanol absoluto frío y los tubos se mantuvieron durante toda la noche a -70°C. Al día siguiente, los tubos fueron centrifugados a 4°C y a 10000g/30min. La pastilla se lavó con etanol 70% y se dejó secar a TA. La muestra de RNA se resuspendió en agua libre de RNAsas y se tomó una alícuota para cuantificar la concentración de RNA total en un espectrofotómetro.

## *V.7 Marcaje de las sondas: TRH y ciclofilina y el oligonucleótido de TRH.*

### *V.7.1 Sondas de DNAC*

El marcaje de las sondas para la hibridación tipo Northern blot, se realizó empleando un kit de "Multiprime DNA labelling systems" (Multiprime DNA RPN1601Y, Amersham). La mezcla de reacción consistió de: 30ng del DNAC de TRH (donado por el Dr. Goodman) o ciclofilina (amplificado por RT-PCR a partir de RNA total del NPV) desnaturalizado por ebullición durante 5 min, 10µl de agua, 6µl de desoxirribonucleótidos, 6µl de buffer, 50µCi de dCTP (<sup>32</sup>P) [3000Ci/nmol] y 2µl de la enzima Klenow; esta mezcla fue incubada por 3h a TA. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 0.5µl de la mezcla de reacción para

calcular el porcentaje de eficiencia de la reacción y el resto se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A los  $0.5\mu\text{l}$  de reacción se le adicionaron  $25\mu\text{l}$  de una solución con (EDTA 10 mM pH8, SDS 0.1% y RNAt 0.5mg/ml). De esta mezcla se colocaron  $5\mu\text{l}$  sobre  $1\text{cm}^2$  de papel DEAE 81 por cuadruplicado; dos de los cuales se lavaron 5 veces por 5min con una solución de fosfato de sodio dibásico 0.5M, una vez por 1min con agua y una vez por 1min con etanol 70%. Cada cuadro de papel fue colocado en un vial y a este se le agregó líquido de centelleo para determinar las desintegraciones por minuto en un contador de centelleo.

El porcentaje de eficiencia de la reacción se calculó por la siguiente relación:

$$\% = \frac{\text{cpms provenientes de papeles lavados}}{\text{cpms provenientes de papeles no lavados}}$$

Para calcular la actividad específica de la sonda marcada fue necesario calcular la cantidad de DNA total sintetizado en la reacción en base a una ecuación reportada por el fabricante.

La cantidad total de DNA:

$$\text{ng} = \frac{(\text{num total de } \mu\text{Ci agregados}) (13.2) (\% \text{ de incorporación})}{(\text{num total de nucleótidos marcados}) (3000\mu\text{Ci/mmol})} + 30\text{ng de DNAC utilizados en la reacción}$$

El cálculo de la actividad específica de la sonda marcada se realizó dividiendo las cpm totales obtenidas entre los  $\mu\text{g}$  totales de DNA que se tenían al final de la reacción.

#### *V.7.1.1 Purificación de las sondas.*

Las sondas marcadas para la hibridación tipo Northern se purificaron por cromatografía de exclusión molecular en una columna de sephadex G50 equilibrada a temperatura ambiente con amortiguador TE (Tris-Cl 10mM, pH8 y EDTA 1mM, pH 8). Durante la cromatografía se colectaron fracciones de aproximadamente  $100\mu\text{l}$ ; las cuales se monitorearon con un contador geiger. La muestra se separó en dos picos que contenían radioactividad; el primero correspondiente a la sonda y el segundo a los nucleótidos libres marcados no incorporados. Se recolectaron las fracciones del primer pico de radioactividad y nuevamente se calculó la actividad específica.

## V. 7.2 Oligonucleótido de TRH.

Se empleó un oligonucleótido de 50 bases que corresponde a las bases 317-367 del DNAC de la TRH de la rata (Lechan, RM et al; 1986).

El oligo se marcó en el extremo 3' (con un kit de Boehringer), utilizando 1.5µl de deoxiribonucleotidil terminal transferasa (25U/µl), amortiguador para la enzima a una concentración final de 1X (Buffer 5X: cacodilato de potasio 1M, Tris HCl 125mM pH 6.6, albúmina de bovino 1.25mg/ml) cloruro de cobalto (CoCl<sub>2</sub>) 1.5mM, 22µCi de α-dATP [<sup>35</sup>S], 2 picomolas del oligonucleótido y agua para un volumen final de 15µl. La mezcla de reacción se incubó por 30min a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se agregó a la mezcla 1µl de EDTA 0.5M y 1µl de tRNA (10mg/ml). El porcentaje de eficiencia de la reacción así como la actividad específica se determinó como se describió en V. 7. 1. El resto de la reacción se precipitó agregando 1.5µl de acetato de sodio (NaOAc) 3M, pH 7 y 2 volúmenes de etanol absoluto y manteniendo la muestra a -70°C de 2-3h. Posteriormente se centrifugó a 4°C y a 10,000g/30min e inmediatamente se eliminó el sobrenadante por decantación. Después la pastilla se resuspendió en 50µl de buffer TE que contenía ditiotreitól (10 mM) y de este volumen se tomó 1µl por duplicado para determinar las cpms totales y la actividad específica de la sonda.

## V. 8 Electroforesis en gel desnaturalizante, transferencia a membranas de nylon, hibridación y post-hibridación.

1-5µg de RNA total se desnaturalizaron a 65°C por 15min e inmediatamente se les agregó una mezcla que contuvo: Formamida, azul de bromofenol 0.015% y xilencianol 0.015%, posteriormente se les agregó formaldehído 2.2M, amortiguador fosfato de sodio 10mM pH 7 y bromuro de etidio. Después las muestras se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa 1% con formaldehído 2.2 M, amortiguador fosfato 10 mM, pH 7. Inicialmente la electroforesis se realizó a 100 mV, una vez que las muestras habían entrado al gel, el voltaje se cambió a 60 mV, se colocó un vidrio sobre el gel para impedir que flotara y una bomba para recircular el amortiguador. Transcurridas 3h aproximadamente de la electroforesis, las muestras de RNA se transfirieron por capilaridad a una membrana de nilón (Hybond-XL; amersham farmacia biotech) utilizando SSC 20X (20X= cloruro de sodio 3M y citrato de sodio 0.3M) y se fijó el RNA a la membrana (crosslinking) mediante su exposición a luz ultravioleta (Stratalinker-stratagene) por 3min. Posteriormente las membranas se

incubaron a 42°C toda la noche en la solución de prehibridación: SSC 5X, Denhardt's 5X (50X= 5g Ficoll, 5g polyvinylpyrrolidone y 5g BSA-V en 100ml), fosfato de sodio 0.1M, pH 6.5, formamida 45%, SDS 0.5% y DNA de esperma de salmón 0.15mg/ml (desnaturalizado a ebullición por 5 min). Transcurrido el tiempo de prehibridación, la solución se eliminó e inmediatamente las membranas se incubaron con la solución de hibridación SSC 5X, Denhardt's 1X, fosfato de sodio 0.06M (pH 6.5), Dextran sulfato 10%, formamida 50%, SDS 0.5%, DNAss desnaturalizado 0.1mg/ml y  $8 \times 10^6$  cpm/ml (act esp=  $9 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g de DNA) del DNAc de TRH marcada con dCTP ( $^{32}$ P) o  $6 \times 10^6$  cpm/ml (act esp= $9 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g de DNA) del DNAc de ciclofilina marcada con dCTP ( $^{32}$ P), ambos previamente desnaturalizados a ebullición por 5 min y se incubaron a 42°C por 18h. Una vez hibridado el RNA con su DNAc correspondiente, las membranas se sometieron a los siguientes lavados para eliminar el pegado inespecífico de la sonda: dos veces por 30 min en una solución de SSC 2X-SDS 0.2% a TA, dos veces por 30 min en una solución de SSC 0.1X-SDS 0.2% a TA y dos veces por 15 min en una solución de SSC 0.1X-SDS 0.2% a 45 °C. Finalmente se cuantificó la señal obtenida de la hibridación del RNAm de TRH o de ciclofilina con el DNAc para el mismo de la siguiente manera: La membrana se expuso por 24h a una pantalla de un phosphoroimager (Molecular Dynamics). Al día siguiente la pantalla se analizó para la cuantificación de la señal de hibridación en una imagen integrada mediante el programa Image Quant a través del cual se calculo el área bajo la curva para cada una de las muestras que corresponde a la intensidad de la señal por muestra, este valor se reporta en unidades arbitrarias. El valor del RNAm de TRH por NPV corresponde al cociente del valor obtenido de la señal de hibridación de TRH entre el valor obtenido de la señal de hibridación de ciclofilina.

## V. 9 Hibridación *in situ*

### V.9.1 Preparación de los tejidos e hibridación y posthibridación.

Los cerebros congelados se seccionaron en cortes coronales de 20  $\mu$ m de grosor en dirección rostro-caudal en un criostato OTA (Bright Instrumental). Los cortes se montaron en portaobjetos (Scientific Instruments) previamente preparados con una cubierta de gelatina y Poly-L-lisina (anexo 1) y posteriormente almacenados a -70 °C hasta su procesamiento. El NPV se colectó en 26 cortes aproximadamente; los cuales se dividieron en tres series incluyendo en cada una de estas, cortes de la región anterior, media y posterior del NPV. La

posición de la cánula se verificó de la siguiente manera: Se colectaron cortes anteriores y posteriores al NPV, enseguida se tiñieron con azul de toluidina (toluidina 0.05% y etanol 70 %) y observados directamente al microscopio. Los cerebros en los que observamos sobre el NPV gliosis alrededor de una lesión causada por la introducción de la cánula se seleccionaron para realizar la hibridación *in situ* para detectar el RNAm de TRH, una vez hibridada una de las series de cada uno de los cerebros seleccionados se corroboró por segunda ocasión la posición de la cánula mediante la observación directa al microscopio de los cortes revelados por microautoradiografía, otra serie fue utilizada para realizar la coexpresión del RNAm de TRH con la proteína c-Fos mediante la combinación de inmunohistoquímica con hibridación *in situ*.

Después se procedió a realizar el protocolo de hibridación *in situ* previamente optimizado en el laboratorio (109); el cual se describe a continuación.

Los tejidos se sometieron a los siguientes tratamientos antes de la hibridación: Fijación durante 10 min en paraformaldehído 4% preparado en PBS 1X (cloruro de sodio 0.136M, fosfato de potasio 1.47mM, fosfato de sodio 8mM, cloruro de potasio 2.68mM). Para eliminar el exceso de fijador, se lavaron dos veces por 5 min c/u en PBS 1X, acetilación por 10 min en una solución a pH 8.0 que contuvo: SSC 4X, anhídrido acético 0.25% y trietanolamina 0.1M. Para eliminar el exceso de solución de acetilación, se lavaron por 5 min en SSC 2X. Posteriormente, se deshidrataron por 2 min en cada uno de los siguientes alcoholes: 75, 80, 95 y 100% e inmediatamente se deslipidaron por 5 min en cloroformo. Finalmente se hidrataron por 2 min en cada uno de los siguientes alcoholes: 100 y 95%.

Para la hibridación, los tejidos se incubaron durante 15h a 37°C con 45 µl de una mezcla que por cada ml contuvo: una picomola del oligonucleótido marcado con dATP [<sup>35</sup>S], 200µl de SSC 20X, 500µl de formamida con Dextran-sulfato 20%, 100µl de amortiguador de fosfatos 1M, pH 7.4 con sarcosyl 10%, 10µl de Denhardtts 100X, 25 µl de DNA de esperma de salmón 10mg/ml, 25µl de RNAt de levadura 10 mg/ml, 100µl de ditiotreitól preparado en acetato de sodio 10mM, pH 7 y 25 µl de Poly A 10mg/ml y cubrieron con parafilm.

Para eliminar el exceso e hibridación inespecífica de la sonda, los tejidos se lavaron con soluciones de diferente concentración de sales y de detergente previamente precalentadas a 45 °C: Se lavaron dos veces de 30 min c/u en SSC1X y formamida 50%, cuatro veces de 30 min c/u en SSC 0.1X y SDS 0.02%. Finalmente se deshidrataron por 2 min en cada uno de los siguientes alcoholes: 75, 80, 95%.

## V. 9. 2 Autorradiografía

Los tejidos se expusieron a un film Biomax-Kodak durante 4 días. Una vez transcurrido el tiempo de exposición, en un cuarto oscuro la señal de hibridación se reveló, sumergiendo el film en revelador GBX (dil 4.6 veces) por 3min, 1min en agua destilada y en fijador GBX (dil 4.6 veces) por 4 min.

## V. 9. 3 Microautorradiografía

Para revelar la señal de hibridación sobre los tejidos, estos se cubrieron en la oscuridad con emulsión fotográfica (Kodak dil: 1:1) y mantuvieron por 15 días a  $-4^{\circ}\text{C}$  (anexo 2). Posteriormente los tejidos se tiñieron con hematoxilina de Harris (anexo3).

## V. 10 Combinación de inmunohistoquímica con hibridación *in situ*.

La inmunolocalización de la proteína c-Fos se combinó con la detección por hibridación *in situ* del RNAm de TRH. Todas las soluciones utilizadas para la realización del protocolo de inmunohistoquímica se prepararon en PBS 1X. Los tejidos se sometieron a los siguientes tratamientos: fijación por 10 min en paraformaldehído 4%. Para eliminar el exceso de fijador se lavaron por 5 min en PBS 1X. Posteriormente los tejidos se sumergieron en Borohidruro de sodio 0.25% durante 5 min y lavaron dos veces por 10 min c/u en PBS 1X, enseguida se permeabilizaron por 30 min a TA en tritón X-100 al 0.2 % y bloquearon durante 3h con una solución de BSA al 3%, heparina al 0.25%, tritón X-100 al 0.1%. Transcurrido el tiempo de bloqueo, los tejidos se incubaron en cámara húmeda a  $4^{\circ}\text{C}$  durante 48h con el anticuerpo primario policlonal dirigido contra la proteína c-Fos (Santa Cruz Biotechnology, #cat: sc-253) (1:800) diluido en una solución de BSA al 1.5%, heparina al 0.25%, tritón X-100 al 0.1 %.

Para el revelado de la señal a nivel celular, los tejidos se colocaron a TA durante 30 min, antes de lavarse dos veces por 10 min c/u con tritón X-100 al 0.1% y una vez por 10 min con PBS 1X, posteriormente se incubaron durante 1h con el anticuerpo secundario anti-IGg de conejo biotilado (1:200) diluido en tritón X-100 al 0.1 % (90 $\mu\text{l}$ /lamina). Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se lavaron tres veces por 5 min c/u con PBS 1X. Después se incubaron durante 45 min con el reactivo ABC-vector preparado en una relación 1:50 (90  $\mu\text{l}$ /lamina) y lavaron tres veces por 5 min c/u con PBS 1X, enseguida se incubaron con DAB [0.5 mg/ml] (3, 3'-diaminobenzidina, sigma cat# D-5637), 5 min antes se agregó al DAB 0.01% de peróxido de hidrógeno. La reacción de revelado se monitoreó con observación de los tejidos en el microscopio a un aumento de 10X. Para detener la reacción, se incubaron

por 3 min en Tris HCl 0.1M pH 6.5 o PBS 1X. Después se deshidrataron por 3 min en etanol al 70 %. Finalmente los tejidos se mantuvieron a TA hasta que se secaron e inmediatamente se guardaron los tejidos a  $-70^{\circ}\text{C}$  o continuó con la hibridación *in situ* para determinar el RNAm de TRH siguiendo el protocolo que se describió previamente. Como control de la especificidad de la señal, se realizó la omisión del anticuerpo primario durante el proceso, esto evito que se obtuviera la señal en los tejidos.

#### *V. 11 Análisis densitométrico semicuantitativo del nivel de expresión del RNAm de TRH en el NPV*

El análisis de la señal del RNAm de la TRH, se realizó en los tejidos previamente expuestos a la emulsión fotográfica, con la ayuda de un microscopio (Zeiss) que tiene acoplada una cámara Sony CCD así como el programa Mercator (Exploranova) mediante el cual se analizaron las imágenes. En campo claro y a un aumento de 5X (amplificación 50X) se trazó el contorno del NPV; el cual se determinó a partir del patrón de tinción con hematoxilina y en campo oscuro se determinó la densidad óptica integrada de la señal (DOI); la cual integra la intensidad de la luz reflejada por los cúmulos de granos brillantes que corresponden a los granos de plata de la emulsión fotográfica que precipitaron sobre las zonas del tejido en las cuales el oligo de TRH marcado radiactivamente hibrido con el RNAm de la TRH. La DOI cuantificada corresponde a la cantidad relativa de RNAm presente en las neuronas TRHérgicas por núcleo. Los valores de densidad óptica del NPV se corrigieron por el ruido y por el área. De cada animal se analizó una serie (8 cortes); en la cual se incluyeron cortes de la región anterior, media y posterior del NPV. Los valores reportados representan el promedio de la señal  $\pm$  ESM por grupo experimental.

#### *V. 12 Conteo Celular*

La cuantificación de las células positivas para el RNAm de TRH, c-Fos y doblemente marcadas, expresando ambos marcadores se realizó en forma manual utilizando el programa Mercator (Explora Anova); el cual permitió en campo claro y a un aumento de 5X (amplificación 50X) trazar el contorno del núcleo paraventricular. Enseguida se creó una rejilla gráfica (80 X 80  $\mu\text{m}$ ) dentro del área trazada que se ajustó de manera automática a las dimensiones del núcleo cuando se pasa al campo microscópico de 40X (amplificación 400X) y con la ayuda de un sistema de platinas motorizadas se realiza un barrido en cada celda de

la rejilla en esta última magnificación. Cada neurona positiva para cualquiera de los marcadores o para ambos fue asignada a una categoría en forma manual. En este caso se utilizaron tres categorías: en la primera se asignaron células positivas para el RNAm de TRH y se marcaron aquéllas en las cuales se observó cúmulos de granos de plata precipitados sobre núcleos teñidos con hematoxilina (color morado suave), en la segunda categoría se asignaron células positivas para la proteína c-Fos y se marcaron aquéllas en las cuales se observó un precipitado de color café sobre el núcleo y en la tercera categoría se asignaron las células positivas para los dos marcadores y se marcaron aquéllas en las cuales se observó el núcleo contrateñido de color café con cúmulos de granos de plata precipitados sobre este. La posibilidad de contar a una neurona dos veces es casi nula porque las células ya contadas quedan marcadas con un símbolo y el barrido de las celdas de la rejilla se realiza en una sola dirección. De cada animal se analizó una serie (6 cortes); en la cual se incluyeron cortes de la región anterior, media y posterior del NPV. Los valores reportados representan el promedio del número de células  $\pm$  ESM por grupo experimental.

### *V. 13 Análisis Estadísticos*

Los datos obtenidos se analizaron utilizando la prueba de ANOVA (Statview) y cuando la significancia fue menor a 0.05, se procedió a realizar una prueba de comparación múltiple de Duncan (Superanova-Statview) para definir la significancia entre los grupos experimentales. En algunos casos fue necesario analizar los datos utilizando una prueba de t-student; (indicándose en las gráficas).

## VI. RESULTADOS

### VI.1. Efecto de la microinyección intracerebroventricular de GABA y bicuculina sobre el nivel de expresión del RNAm de la TRH en el NPV y AP/HA, el contenido celular de TRH en el HMB, corticosterona, tirotrópina y prolactina en suero.

En un primer acercamiento, se inyectó ICV la bicuculina, antagonista GABAR-A o el GABA y determinó la concentración sérica de corticosterona como un indicador de la activación del eje adrenal así como el nivel de RNAm de la TRH en el NPV y las dos hormonas blanco de la TRH; la tirotrópina y la prolactina. Como puede observarse en la fig 3, la concentración basal de corticosterona en suero no se modificó en respuesta a cualquiera de las dosis de bicuculina, si bien se observa una tendencia a aumentar con la dosis mas alta [500pm]. El tratamiento con GABA [5µm] aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración basal de corticosterona en suero de 4 y 2 veces a los 30 y 60 min respectivamente.

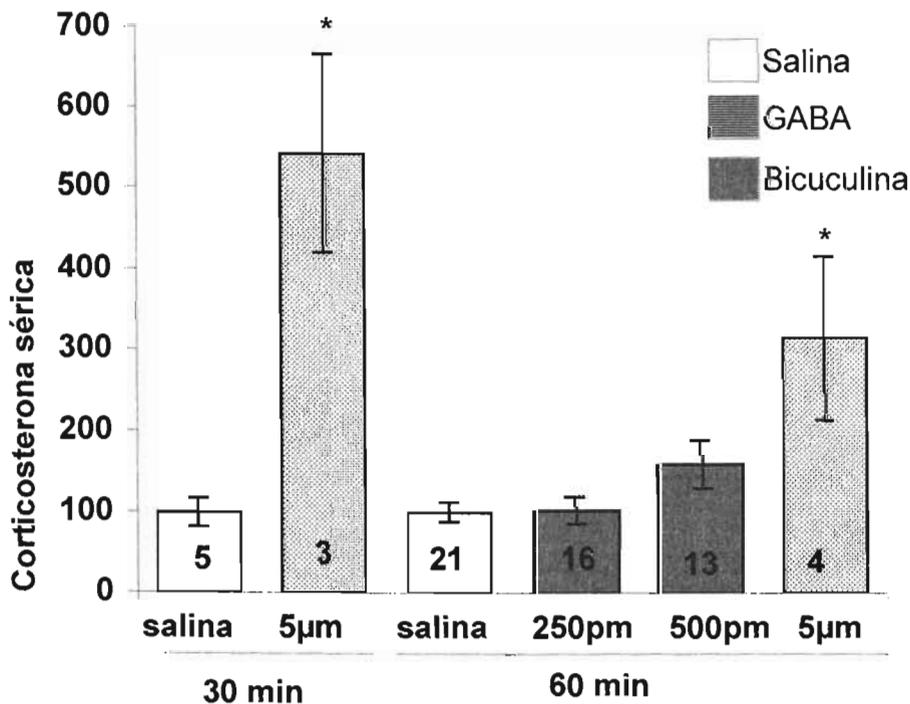


Fig. 3. Efecto de la aplicación intracerebroventricular de GABA o bicuculina sobre la concentración de corticosterona en suero. Los histogramas representan los valores promedio  $\pm$  el error estándar de la media (ESM). Los números dentro de las barras indican el número de animales (n) por grupo experimental. \*:  $p < 0.05$  con respecto a su control. La concentración de

corticosterona en suero fue determinada por radioinmunoensayo. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al grupo inyectado con solución salina.

La expresión del RNAm de la TRH se determinó en el NPV y en el AP/HA, esta última región involucrada en el control de la presión arterial mediada por la TRH (110). La dosis de [250pm] de bicuculina no afectó el nivel de expresión del RNAm en cualquiera de las dos regiones analizadas mientras que la aplicación de [500pm] de bicuculina aumentó significativamente el nivel de RNAm de la TRH en un 63% y 79% ( $p < 0.05$ ) en el NPV y AP/HA respectivamente, esto comparado con el grupo control (Fig. 4 y 5). En el NPV no encontramos cambio en el nivel del RNAm de TRH después de la aplicación de GABA. A diferencia de lo observado en el NPV, la aplicación de GABA [5 $\mu$ m] causó una reducción significativa en un 37% ( $p < 0.05$ ) sobre el nivel de expresión del RNAm de la TRH en el AP/HA 30 min después de la aplicación (fig 5).

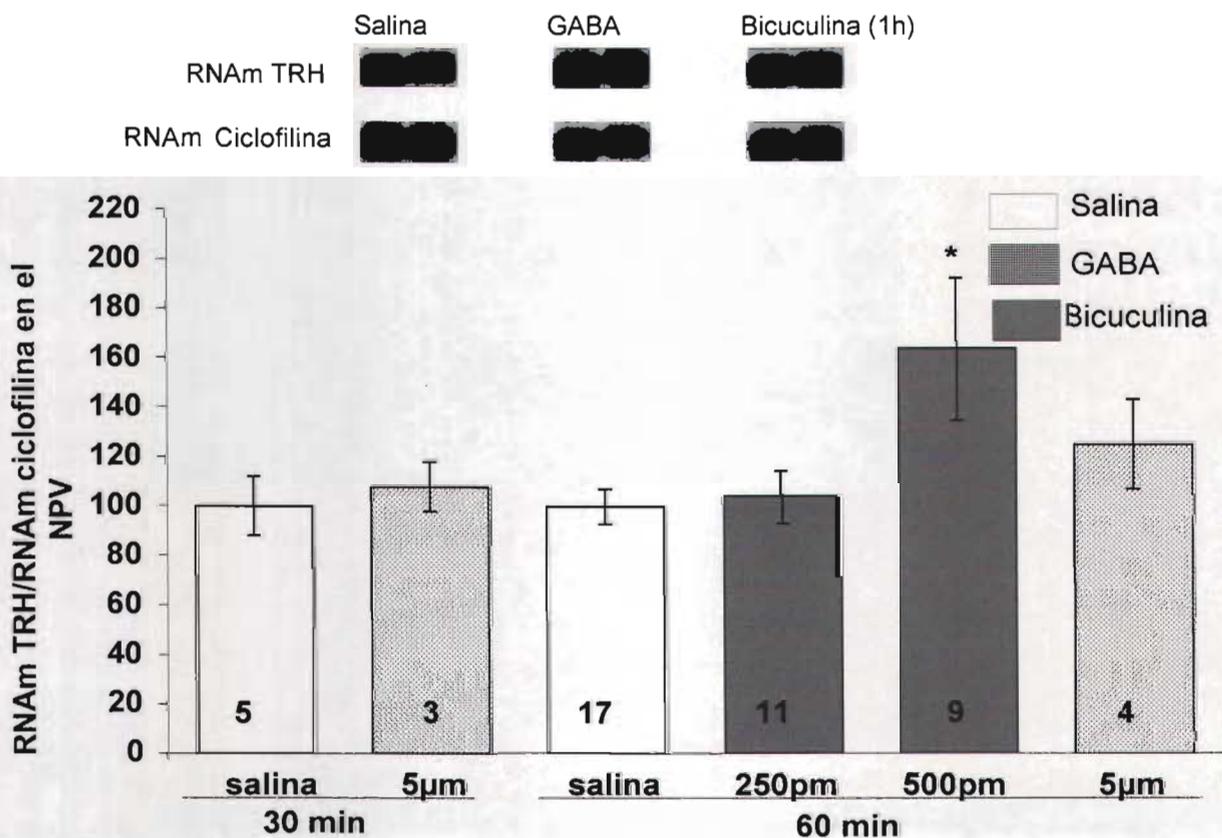
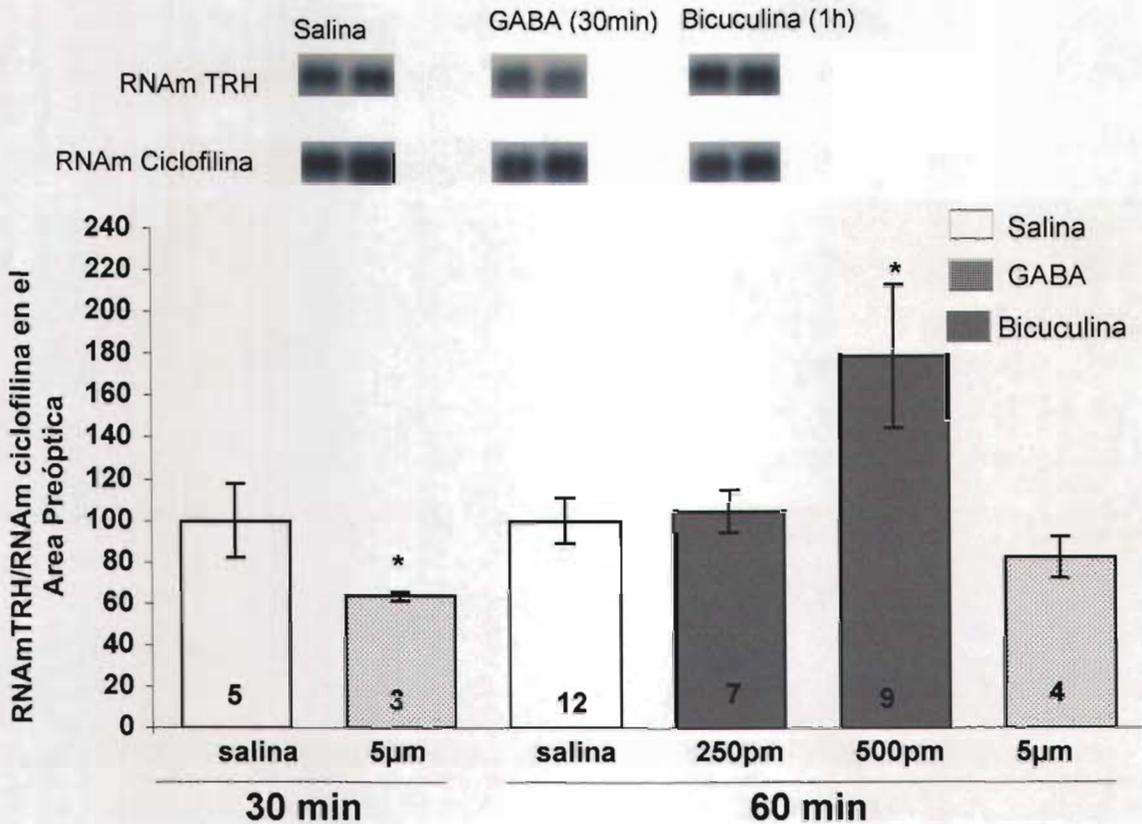


Fig. 4. Efecto de la microinyección intracerebroventricular de GABA o bicuculina sobre el nivel de expresión del RNAm de TRH en el núcleo paraventricular. Los histogramas representan los valores promedio  $\pm$  ESM. Los números dentro de las barras indican el número de animales (n) por grupo experimental. \*:  $p < 0.05$  con respecto a su control. El nivel

de RNAm de TRH fue cuantificado por Northern blot y corregido por el nivel del RNAm de ciclofilina. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al grupo inyectado con solución salina.

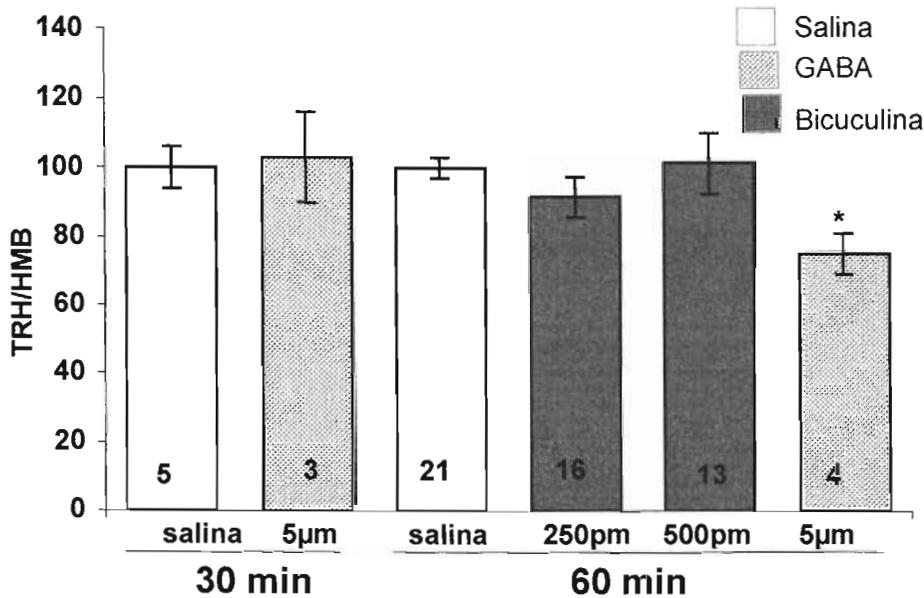


**Fig. 5. Efecto de la microinyección intracerebroventricular de GABA o bicuculina sobre el nivel de expresión del RNAm de TRH en el AP/HA.** Los histogramas representan los valores promedio  $\pm$  ESM. Los números dentro de las barras indican el número de animales (n) por grupo experimental. \*:  $p < 0.05$  con respecto a su control. El nivel de RNAm de TRH fue cuantificado por Northern blot y corregido por el nivel del RNAm de ciclofilina. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al grupo inyectado con solución salina.

No se observaron cambios en el contenido celular de la TRH en el HMB, ni en la concentración de tirotropina en suero en respuesta a cualquiera de las dosis de bicuculina; sin embargo la aplicación de GABA [5µm] después de una hora causó una disminución significativa del 25% y 36 % ( $p < 0.05$ ) en el contenido celular de TRH y concentración sérica de tirotropina respectivamente, esto comparado con el grupo control inyectado con solución salina (Fig. 6 y 7, panel A). También se determinó el contenido celular de TRH-gly, como un posible indicador de cambios en la tasa de síntesis del péptido. Al igual que con la TRH, la aplicación de bicuculina no afectó el contenido de TRH-gly en el HMB mientras que la

aplicación de GABA causó una disminución significativa del 28% ( $p < 0.05$ ) 30 min después del tratamiento (resultados no mostrados).

En contraste con lo observado en tirotropina, la aplicación de bicuculina [500pm] aumentó significativamente en un 100% ( $p < 0.05$ ) la concentración de prolactina en suero mientras que el GABA no afectó la concentración basal de prolactina (Fig. 7, panel B).

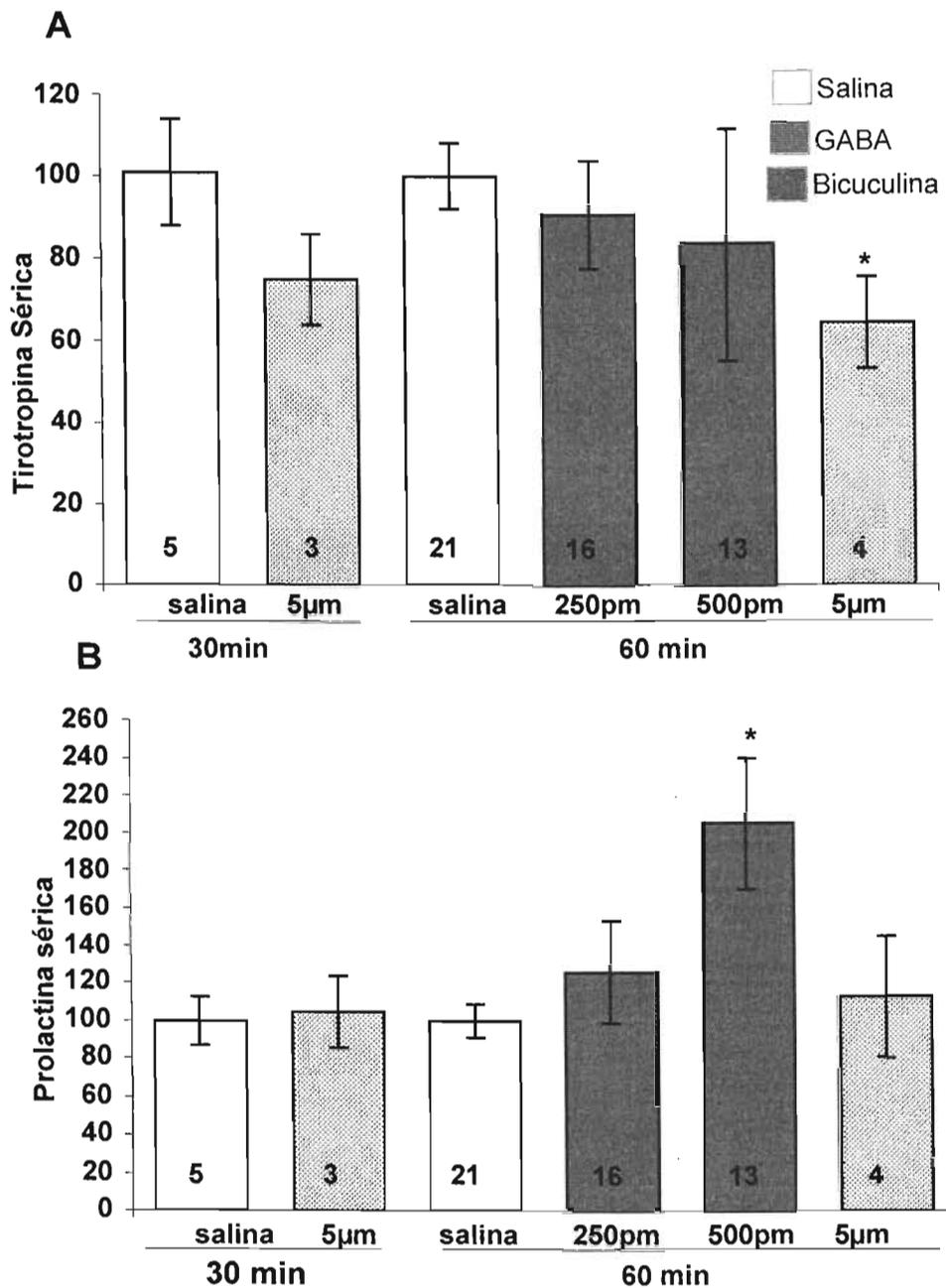


**Fig 6. Efecto de la microinyección intracerebroventricular de bicuculina o GABA sobre el contenido celular de TRH en el HMB.** Los histogramas representan los valores promedio  $\pm$  ESM. Los números dentro de las barras indican el número de animales (n) por grupo experimental. El contenido celular de TRH en el HMB se determinó por radioinmunoensayo. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al grupo inyectado con solución salina.

**VI. 2. Efecto de la microinyección de GABA o bicuculina en el NPV derecho sobre las neuronas TRHérgicas.**

Con el fin de corroborar el efecto estimulador de bicuculina ICV sobre la expresión del RNAm de TRH, así como definir en forma mas precisa el papel de la transmisión GABAérgica sobre el nivel de expresión del RNAm en las neuronas TRHérgicas del NPV, se procedió a implantar a un grupo de ratas con una cánula guía sobre el NPV derecho (Fig. 8, panel A). Una hora después de la microinyección los animales se sacrificaron y se determinó

en cortes coronales de cerebro que incluyeron el NPV el nivel de expresión de RNAm de la TRH.



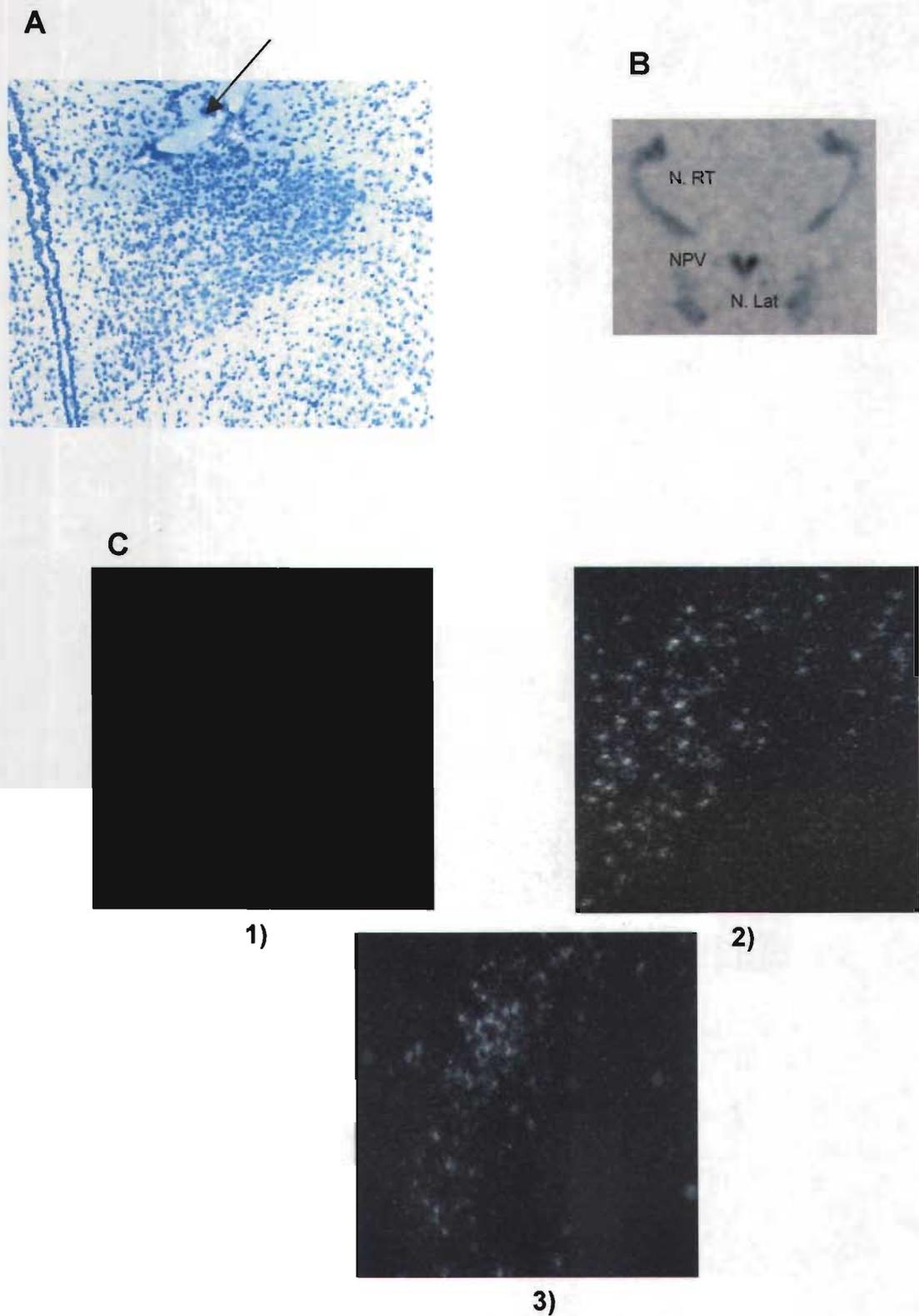
**Fig. 7.** Efecto de la aplicación intracerebroventricular de bicuculina o GABA sobre la concentración sérica de tirotrópina (A) y prolactina (B) en suero. Los histogramas representan los valores promedio  $\pm$  ESM. Los números dentro de las barras indican el número de animales (n) por grupo experimental. \*:  $p < 0.05$ . La concentración de tirotrópina y prolactina en suero se determinó por radioinmunoensayo. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al grupo inyectado con solución salina.

En cortes coronales de cerebros de animales controles, se obtuvo una señal de hibridación específica del RNAm de TRH y se delimitó a las regiones donde previamente se había reportado (Fig. 8, panel B). La distribución de la señal del RNAm de TRH en dirección rostro-caudal del NPV determinada por hibridación in situ y revelada por microautoradiografía, se observó como previamente se había reportado (109) en la región anterior (Fig. 8 C, 1), media (Fig. 8 C, 2) y posterior (Fig. 8 C, 3).

Como se observa en la Fig. 9 y 10, panel C la microinyección de bicuculina [100pm] en el NPV no afectó la intensidad de la señal de hibridación del RNAm de TRH en cualquiera de los dos lados del NPV comparado con el control (núcleo paraventricular derecho inyectado con solución salina). Sin embargo la microinyección de GABA [0.5µm] causó una reducción en la expresión del RNAm de la TRH del 35% y 28% en el núcleo paraventricular derecho e izquierdo respectivamente, esto comparado con el grupo control (Fig. 10 panel B).

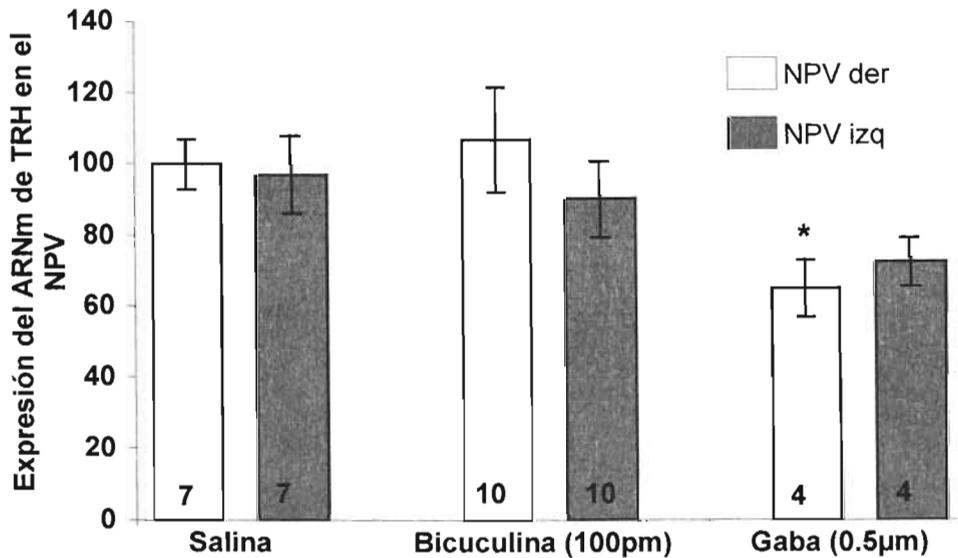
### **VI. 3. Detección de la proteína c-Fos en las neuronas TRHégicas del NPV.**

Como puede observarse en la tabla 3, el número total de células expresando el RNAm de TRH en el NPV derecho no se modificó en respuesta al tratamiento con GABA o bicuculina, esto comparado con el grupo control (paraventricular derecho inyectado con solución salina). Como previamente se había reportado (53), la microinyección de bicuculina causó un aumento significativo en el número de células expresando la proteína c-Fos de 87% y 50% en el NPV derecho (tabla 3 y Fig. 11, panel C) e izquierdo respectivamente, mientras que la microinyección de GABA no causó la expresión de la proteína c-Fos las neuronas del NPV (tabla 3 y Fig. 11, panel B). Tampoco el número de neuronas que coexpresaron el RNAm de TRH y la proteína c-Fos en ambos núcleos, se modificó en respuesta a cualquiera de los tratamientos (tabla3).



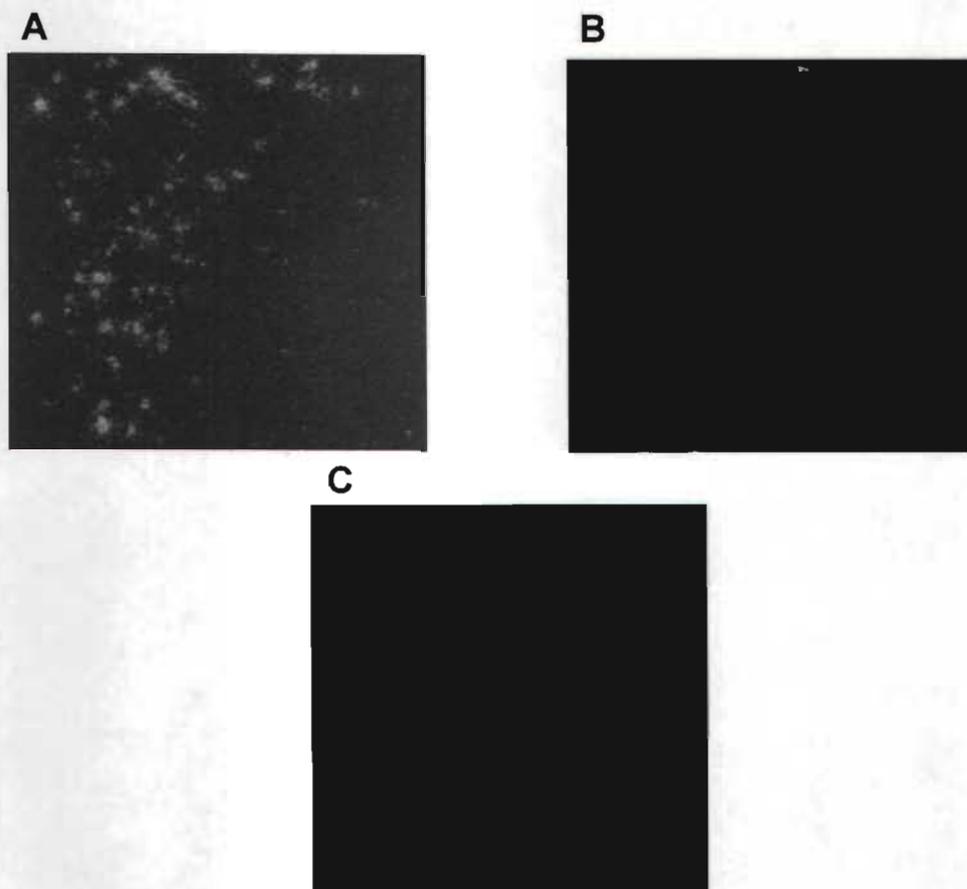
**Fig. 8. Localización del sitio de la microinyección y señal del RNAm de TRH en el NPV.** A) Microfotografía a un aumento de 5X (amplificación 50X) de un corte de cerebro teñido con hematoxilina que muestra el sitio de la posición de la cánula en el NPV (flecha). B) Imagen autoradiográfica que muestra la señal de hibridación del RNAm de TRH delimitada a

regiones específicas previamente reportadas: núcleo reticular tálamico, núcleo paraventricular (NPV) y núcleo lateral (N. Lat) y C) Microfotografías a un aumento de 5X (amplificación 50X) de la distribución de la señal del RNAm de TRH a lo largo del NPV revelada por microautoradiografía. 1) Región anterior, 2) Región media y 3) Región posterior.



**Fig. 9. Efecto de la aplicación de GABA o bicuculina en el NPV derecho sobre el nivel de expresión del RNAm de la TRH.** Los histogramas representan los valores promedio  $\pm$  ESM. Los números dentro de las barras indican el número de animales (n) por grupo experimental. \* $p < 0.05$  con respecto a su control. El RNAm de TRH fue semicuantificado por hibridación in situ. Los valores son expresados en porcentaje con respecto al NPV derecho del grupo inyectado con solución salina.

En cuanto a la concentración de hormonas en suero, de acuerdo a lo reportado (53) observamos que la microinyección de bicuculina [100pm] sobre el NPV derecho causó un incremento del 100% aproximadamente sobre la concentración basal de corticosterona en suero; esto comparado con el grupo control tratado con solución salina mientras que la aplicación de GABA [0.5µm] no afectó la concentración basal de corticosterona en suero. Con respecto a la concentración sérica de tirotropina y prolactina, ninguna se modificó en respuesta a los tratamientos diferentes (tabla 4)

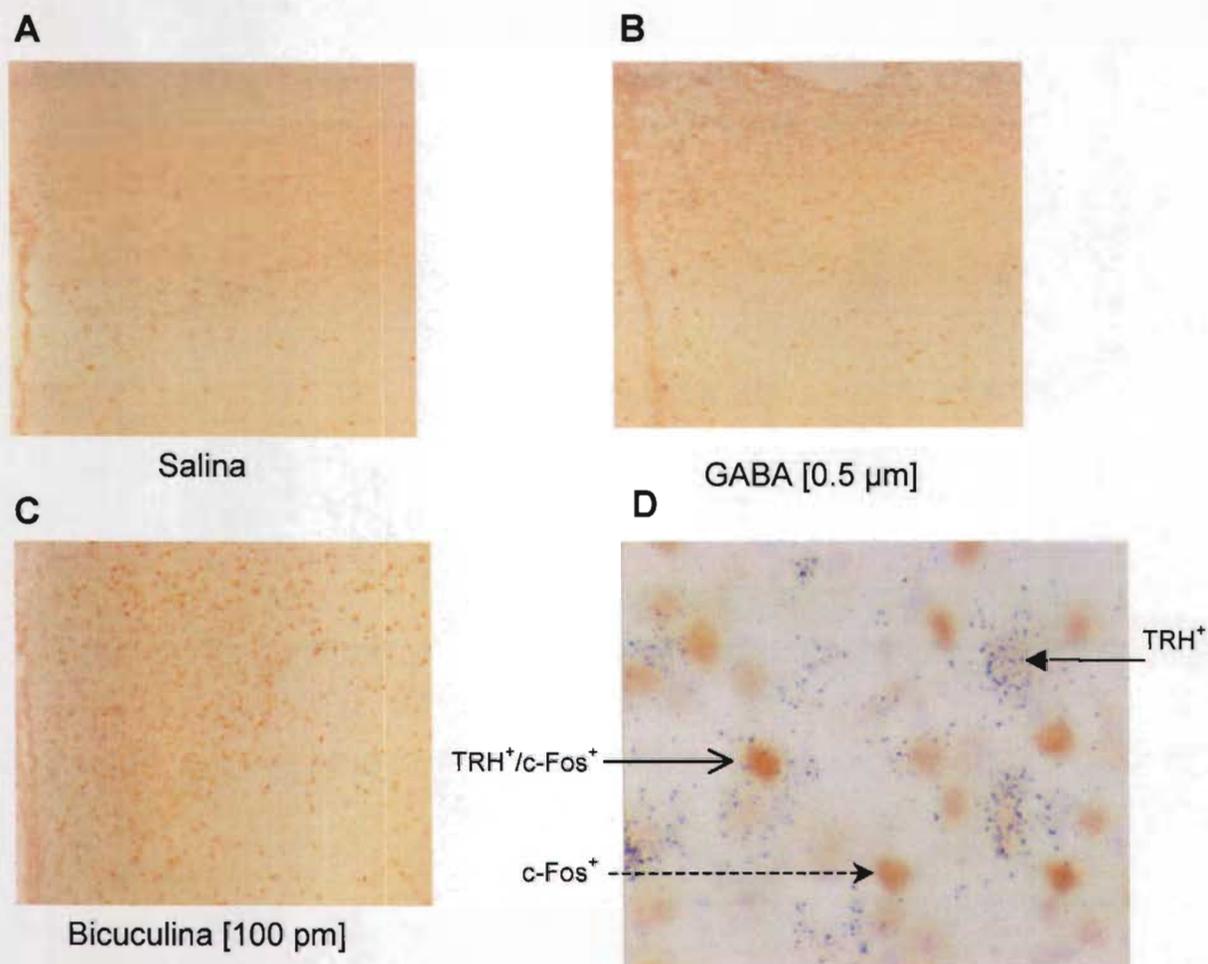


**Fig. 10. Microfotografías representativas de la señal del RNAm de TRH en el NPV, después de la inyección de salina (A), GABA 0.5 $\mu$ m (B) o bicuculina 100pm (C). El RNAm de TRH se detectó por hibridación in situ y la señal se reveló por microautoradiografía. Las células TRH positivas se detectaron por cúmulos de granos de plata que en campo oscuro a un aumento de 5X (amplificación 50X) se observan como granos brillantes.**

Tratamiento	NPV DER			NPV IZQ		
	RNAm TRH	cFos	TRH/ c-Fos	RNAm TRH	cFos	TRH/ c-Fos
SAL n=5	100 $\pm$ 7	91 $\pm$ 22	18 $\pm$ 3	103 $\pm$ 7	71 $\pm$ 11	21 $\pm$ 7
BICC n=6	108 $\pm$ 15	187 $\pm$ 31	29 $\pm$ 5	114 $\pm$ 11	150 $\pm$ 38	31 $\pm$ 7
GABA n=4	83 $\pm$ 12	44 $\pm$ 25	12 $\pm$ 4	85 $\pm$ 10	58 $\pm$ 20	12 $\pm$ 6

**Tabla 3. Conteo de células en el NPV en respuesta a la microinyección de GABA o bicuculina.** Número de células positivas para el RNAm de TRH, la proteína c-Fos y dobles positivas expresado en porcentaje con respecto al grupo control (núcleo paraventricular

derecho inyectado con solución salina) en respuesta a la microinyección de GABA [0.5µm] o bicuculina [100pm]. El número entre paréntesis indica ± el ESM y el número de animales por grupo experimental está indicado en cada tratamiento.



**Fig. 11. Detección de la proteína c-Fos en neuronas TRHérgicas del NPV.** Microfotografías representativas en campo claro a un aumento 5X (amplificación 50X) de la expresión de c-Fos en respuesta a la microinyección de salina (A), GABA (B) o bicuculina (C). La proteína c-Fos se detectó por inmunocitoquímica y reveló con un anticuerpo acoplado a peroxidasa utilizando diaminobenzidina como sustrato; lo cual generó un precipitado café sobre el núcleo. La colocalización de c-Fos y el RNAm de la TRH se realizó por un doble marcaje. El panel D corresponde a una imagen representativa en campo claro a un aumento de 40X (amplificación 400X) de la colocalización, en la que se observa núcleos cafés que corresponden a células positivas para c-Fos (flecha punteada), núcleos con precipitados de granos de plata, que corresponden a células positivas para el RNAm de TRH (flecha cerrada) y núcleos cafés con granos de plata, que corresponden a las células doblemente marcadas (flecha abierta).

Tratamiento	Corticosterona	TSH	<i>PRL</i>
Salina (7)	100±24	101±18	100±25
Bicc (10)	219±49*	93±14	77±11
GABA (4)	161±48	84±10	168±67

**Tabla 4. Concentración de hormonas en suero**, expresado en porcentaje con respecto a el grupo control (inyectado con solución salina) en respuesta a la microinyección de GABA [0.5µm] y bicuculina [100pm]. El número entre paréntesis indica el número de animales por grupo experimental. \*: p<0.05 con respecto al grupo control.

## VII. DISCUSIÓN

En el hipotálamo la transmisión GABAérgica juega un papel importante en la regulación de funciones neuroendócrinas como son: el balance de los fluidos y la energía, la temperatura corporal, el tono cardiovascular, los esteroides gonadales. Dicha actividad esta mediada por la regulación de la actividad de las neuronas hipofisiotrópicas del NPV, las cuales son inervadas por una gran cantidad de sinápsis GABAérgicas provenientes de diferentes regiones del SNC incluyendo: la zona subparaventricular, los núcleos dorsomedial, lateral y medial del hipotálamo y los núcleos anteromedial, fusiforme, transverso e intrafascicular del estriado terminal (25 y 92). Previamente se ha mostrado la expresión de receptores tipo B así como varias subunidades de los receptores tipo A en el NPV (29-31 y 81). Además se ha observado que el bloqueo local de la transmisión GABAérgica tipo A activa las neuronas del NPV, determinado por un aumento en la expresión de la proteína c-Fos. Específicamente se ha reportado un aumento en la biosíntesis del RNAm de CRH (53, 88 y 92); lo cual ha llevado a proponer la existencia de un tono GABAérgico inhibitorio sobre la actividad de dichas neuronas. Al igual que las neuronas CRHérgicas, sabemos que las neuronas TRHérgicas del NPV son blanco del GABA, ya que se ha demostrado que las neuronas TRHérgicas parvocelulares reciben contactos sinápticos GABAérgicos (26).

En el presente trabajo nos enfocamos en demostrar la participación del GABA en la regulación de la biosíntesis de la TRH. Encontramos que el bloqueo de la transmisión GABAérgica mediante la inyección icv de bicuculina en ratas macho, aumentó el nivel de RNAm de TRH en el NPV, mientras que la aplicación de GABA no mostró ningún efecto. Estos resultados sugirieron la existencia de un tono GABAérgico inhibitorio sobre la biosíntesis de la TRH. En los mismos animales, monitoreamos el contenido celular de la TRH-gly (el precursor inmediato de la TRH) y la TRH en la eminencia media, la concentración circulante de las dos hormonas blanco de la TRH; la TSH y la PRL. Encontramos que la aplicación icv de GABA disminuyó el contenido celular de la TRH-gly, de la TRH y la TSH en suero. Otros autores han propuesto que el GABA inhibe la secreción de la TSH a través de un mecanismo central y no a nivel de la adenohipófisis debido a que la aplicación de GABA a cultivos primarios de adenohipófisis, no afecta la concentración de tirotrópina (104). La disminución en la TSH circulante podría ser un reflejo de bloqueo de la liberación de la TRH inducida por el GABA como se ha propuesto durante la exposición al frío. En esta condición experimental, aumenta la liberación de la TRH de la EM y en

consecuencia se aumenta la TSH circulante. La administración de GABA icv, bloquea la respuesta de TSH al frío (102), sugiriendo que el GABA inhibe la liberación de TRH. Hasta el momento, no se ha demostrado que el GABA regule directamente la secreción de TRH, sin embargo se ha propuesto que el GABA puede regular la liberación de TRH de la EM a través de modular la secreción de dopamina esto con base en que el pretratamiento con un antagonista para los receptores de dopamina (pimozide) es capaz de bloquear el efecto inhibitorio del GABA sobre la secreción de TSH a la sangre. Aunado a esta evidencia, en experimentos *in vitro*, se ha observado que la incubación de rebanadas hipotálamicas con dopamina inhibe la liberación de la TRH (112). En conjunto estos resultados sugieren que la disminución en la TSH circulante puede ser un reflejo de una inhibición en la liberación de TRH de la EM. La disminución en el contenido de la TRH y su precursor inmediato, y la no correlación con un aumento en la liberación de la TRH, nos lleva a proponer que el GABA no sólo inhibe la liberación, sino también modifica etapas postraduccionales de la síntesis de la TRH. La aplicación icv de bicuculina provocó un aumento en el nivel circulante de PRL, esto correlaciona con la inhibición de la liberación de dopamina en el sistema tuberoinfundibular reportado por otros autores y en consecuencia bloqueo del tono dopaminérgico inhibitorio sobre la secreción de PRL de la adenohipófisis (113 y 114).

Cuantificamos el nivel de RNAm de la TRH en el AP, otra región del cerebro donde se sintetiza TRH, se localizan proyecciones GABAérgicas y se expresan los dos tipos de receptores, encontrándose mayoritariamente el receptor tipo A. A diferencia de lo observado en el NPV, encontramos una relación inversa en el nivel del RNAm de TRH entre la administración intracerebroventricular de la bicuculina y el GABA. Estos resultados apoyan un efecto negativo del GABA sobre el nivel basal de RNAm de TRH en esta zona mediado a través de su receptor tipo A, quedando por definir los núcleos TRHérgicos específicos del AP donde se regula la biosíntesis de la TRH. Previamente demostramos un incremento significativo sobre el nivel de RNAm de la TRH en el AP/HA en respuesta a la exposición al frío (46) y recientemente se reportó que la termogénesis inducida por la exposición al frío en el AP/HA esta mediada por receptores de GABA tipo A (115). Con base en estas evidencias, podemos sugerir que el GABA es un modulador de la biosíntesis de la TRH en respuesta al frío en el AP.

Para definir en forma precisa la acción de GABA sobre la regulación basal del nivel de RNAm de la TRH en el NPV, aplicamos GABA o bicuculina directamente sobre el NPV derecho. Previamente otros autores demostraron que la aplicación de bicuculina sobre el

NPV induce la expresión de c-Fos en la región parvocelular del NPV, así como en el hipotálamo lateral (53), este efecto fue reproducido en nuestros experimentos así como la activación del eje adrenal, determinado por un incremento en el nivel circulante de corticosterona. Al cuantificar el número de neuronas TRHérgicas que expresaron a la proteína c-Fos en la zona parvocelular del NPV encontramos un ligero incremento no significativo. Al determinar el nivel de RNAm de la TRH en el NPV por hibridación in situ, encontramos que este no se modificó en respuesta a la bicuculina; sin embargo la aplicación de GABA causó una disminución significativa en el nivel de RNAm de la TRH, en la zona ipsilateral y contralateral. En conjunto nuestros resultados sugieren que el GABA regula negativamente la biosíntesis del RNAm de TRH en el NPV del hipotálamo. Sin embargo, existe una discrepancia en el efecto observado cuando aplicamos el GABA o la bicuculina icv o sobre el NPV derecho. El hecho de encontrar efecto de la bicuculina sobre la biosíntesis del RNAm de TRH en el NPV cuando se aplica icv, nos indica la existencia de un tono GABAérgico inhibitorio. No es sorprendente entonces, no observar efecto sobre el RNAm de TRH cuando se aplica el GABA icv, ya que los receptores GABAérgicos se encuentran previamente ocupados al momento de la inyección. Cuando inyectamos la bicuculina directamente sobre el NPV no observamos cambio sobre el RNAm de TRH, contrario a lo que ocurre cuando se aplica icv. Con base en la expresión de la proteína c-Fos, creemos que la dosis de la droga y el tiempo al que se determinó el efecto, es adecuado ya que se observó la activación de las neuronas del NPV. Por otro lado, cuando se aplicó el GABA sobre el NPV se observó un efecto inhibitorio sobre la biosíntesis del RNAm de TRH, sugiriendo entonces la existencia de dos vías GABAérgicas inhibitorias que regulan la biosíntesis de TRH en el NPV. En el caso del tono inhibitorio, el efecto de GABA es indirecto y éste debe regular la liberación de una molécula estimuladora proveniente de una interneurona que contacta a las neuronas TRHérgicas. A este respecto, se ha reportado que el GABA regula la secreción de noradrenalina en el hipotálamo anterior (116), así como resultados preliminares indican que la aplicación icv de noradrenalina induce un aumento en el nivel de expresión del RNAm de TRH en el NPV, si bien hay evidencias que apoyan a la noradrenalina como la molécula intermediaria en la modulación GABAérgica no podemos descartar al ácido glutámico, un neurotransmisor estimulador que también contacta a las neuronas TRHérgicas del NPV (117). Por lo tanto es necesario definir farmacológicamente el efecto de GABA sobre el nivel de RNAm de TRH en el NPV, aplicando icv antagonistas noradrenérgicos o glutamatérgicos previo a la inyección de GABA y analizar el nivel de expresión del RNAm de TRH. Un ejemplo

de dos vías GABAérgicas, se ha descrito sobre las neuronas CRHérgicas parvocelulares donde se ha propuesto un efecto inhibitorio del GABA directo sobre las neuronas de CRH y un tono GABAérgico inhibitorio mediado a través de otra molécula estimuladora. Hasta el momento se desconocen que etapas de la biosíntesis del TRH y el mecanismo intracelular involucrado en la regulación de las neuronas TRHérgicas mediada por el GABA en el NPV. La disminución en el nivel del RNAm de TRH, generada por el GABA pueden ser un reflejo de variación en la velocidad de transcripción, procesamiento y/o vida media del RNAm. Uno de los mecanismos descritos por el cual el GABA inhibe la transcripción de genes en el hipotálamo, ocurre a través de la inducción del represor de la transcripción CREM/ICER (118-119). Este factor tiene como genes blanco, aquellos que son regulados por un aumento en los niveles de AMPc y en consecuencia un aumento de CREB-fosforilado y entre ellos se encuentra el gene de la TRH (52 y 56). Proponemos que este puede ser el mecanismo involucrado si la tasa de transcripción esta afectada en nuestras condiciones. Por otro lado debido a que la disminución sobre el nivel de RNAm de TRH inducido por GABA ocurre rapidamente (1h) no podemos descartar un efecto sobre la estabilidad del RNAm. Por análisis de secuencia, se encontró que el RNAm de TRH en su extremos 3' contiene secuencias involucradas en su estabilidad. Aunado a esto, se reportó que el GABA disminuye la expresión superficial de receptores GABA-A através de modificar la vida media de los RNAm de algunas de las subunidades del receptor (120). En resumen los resultados obtenidos indican la participación de la neurotransmisión GABAérgica en la regulación de la biosíntesis basal de la TRH, quedando por definir si el GABA participa en las respuestas transitorias de las neuronas TRHérgicas observadas en condiciones experimentales como la exposición al frío o la estimulación de la glándula mamaria.

## **VIII. CONCLUSIONES**

- \*Nuestros resultados sugieren que la transmisión GABAérgica participa en la regulación de la biosíntesis y la liberación de las neuronas TRHérgicas del NPV.
- \*En el área preóptica, la transmisión GABAérgica regula la biosíntesis del RNAm de la TRH en el AP/HA a través de su receptor tipo A.
- \*El GABA modula la biosíntesis del RNAm de TRH a través de un mecanismo independiente de la activación de c-Fos.

## **IX. PERSPECTIVAS**

- \* Determinar la expresión de los receptores GABAérgicos en las neuronas TRHérgicas del NPV y AP/HA.
- \* Caracterizar el mecanismo intracelular por medio del cual el GABA regula la biosíntesis de la TRH.
- \*Definir el papel del GABA en la regulación de la biosíntesis de la TRH durante la exposición al frío.

## X. REFERENCIAS:

- 1.- Squire, L. R; Bloom, F. E; McConnell, S. K; Roberts, J. L; Spitzer, N. C and Zigmond, M. 2003. The hypothalamus: an overview of regulatory systems En *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. Segunda Edición. Pg: 897-909.
- 2.- Boler, J; Enzmann, K; Bowers, C. Y and Schally, A. V. 1969. The identity of chemical and hormonal properties of Thyrotropin-Releasing Hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline-amide. *Biochem Biophysics Res Common*. 37: 705-710.
- 3.- Burgus, R; Dunn, T; Desiderio, D and Guillemin, R. 1969. Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d' origine ovine: mise en evidence par spectrometrie de masse de la sequence PCA-His-Pro-NH<sub>2</sub>. C. R. Acad Sci. (Paris). 269: 1870-1873.
- 4.- Murakami, M; Mori, M; Kato, Y and Kobayashi, I. 1991. Hypothalamic Thyrotropin-Releasing Hormone regulates pituitary Thyrotropin beta- and alpha-subunit mRNA levels in the rat. *Neuroendocrinology*. 120: 276-280.
- 5.- Haiseneder, D. J; Ortolano, G. A; Dalking, A. C; Yasing, M. and Marshall, J. C. 1992. Differential actions of Thyrotropin (TSH)-Releasing Hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology*. 130: 2917-2923.
- 6.- Grosvenor, C. E. and Mena, F. 1980: Evidence that Thyrotropin-Releasing Hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology*. 107: 863-868.
- 7.- Blake, C. A. 1974. Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrus rats. *Endocrinology*. 94: 503-508.
8. - Lechan, R. M; Wu, P and Jackson, I. M. 1986. Immunolocalization of the Thyrotropin-Releasing Prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology*. 119: 1210-1216.
- 9.- Segerson, T. P; Hoefler, H; Childers, H; Wolfe, P; Jackson, M and Lechan, R. M. 1987. Localization of Thyrotropin-Releasing Prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. 121: 98-107.
10. - Lechan, R. M and Toni, R. 1992. Thyrotropin-Releasing Hormone neuronal systems in the central nervous system. Cap 10. Edit: Charles B Nemeroff En: *Neuroendocrinol*. Ed: CRC Press USA. 279-288.

11. - Bruhn, T. O; Rondeel, J. M; and Jackson, I. M. D. 1998. Thyrotropin-Releasing Hormone gene expression in the Anterior Pituitary. IV. Evidence for Paracrine and Autocrine Regulation. *Endocrinology*. 139: 3416-3422.
- 11.- Aratán, S. S; Schafmann, R and Lechan, R. M. 1990. ProTRH gene expression by fetal pancreatic islets in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 168: 952-958.
- 13.- Carnell, N. E; Feng, P; Kim, N. E and Wilber, J. F. 1992. Preprothyrotropin-Releasing Hormone mRNA and TRH are present in the rat heart. *Neuropeptides*. 22: 209-212.
- 14.- Dorsey, C. A and Lee, S. 1990. PreproTRH mRNA from placenta and testes has extended poly A+ tails. *73rd Annual meeting of endocrine society*. Atlanta (resume).
- 15.- Feng, P; Gu, J and Kim, U. J; Carnell, N. E and Wilber, J. F. 1993. Identification and localization and developmental studies of rat Prepro Thyrotropin-Releasing Hormone mRNA in the testis. *Neuropeptides*. 24: 63-69.
- 16.- Metcalf, G and Jackson, I. M. D. 1989. Thyrotropin-Releasing Hormone: biomedical significance. *Annals of the New York Academic of Sciences*. 553: 579-582, 269-304, 610-614.
- 17.- Yamada, M; Radovick, S; Wondisford, F. E; Nakayama, Y; Weintraub, B. D and Wilber, J. F. 1990. Cloning and Structure of Human Genomic DNA and Hypothalamic cDNA Encoding Human PreproThyrotropin-Releasing Hormone. *Molecular Endocrinology*. 4: 551-556.
- 18.- Lee, S. L; Steward, K and Goodman, R. H. 1988. Structure of the gene encoding rat Thyrotropin-Releasing Hormone. *J. Biol Chem*. 263: 16604-16609.
- 19.- Satoh, T; Yamada, M; Monden, T; Iizuka, M and Mori, M. 1992. Cloning of the mouse hypothalamic Preprothyrotropin-Releasing Hormone (TRH) cDNA and tissue distribution of its mRNA. *Molecular Brain Research*. 14: 131-135.
- 20.- Perez-Martinez, L; Uribe, R. M; Sanchez, E; Carreón-Rodriguez, A; Chavez, L; Zacarias, M; Joseph-Bravo, P and Charli J. L. 1999. Regulation of TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of rodent hypothalamus. *Current Topics in Neurochemistry*. 2: 79-88.
- 21.- Liposits, Z; Paull, W. K; Wu, P; Jackson, I. M. D and Lechan, R. M. 1987. Hypophysiotrophic Thyrotropin- Releasing Hormone (TRH) synthesizing neurons: Ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action. *Histochemistry*. 88: 1-10.

- 22.- Shioda, S. and Nakay, Y. 1993. Medullary synaptic inputs to Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH)-containing neurons in the hypothalamus: an ultra structural study combining WGA-HRP anterograde tracing with TRH immunocytochemistry. *Brain Research*. 625: 9-15.
- 23.- Wittmann, G; Liposits, Z; Lechan, R. M and Fekete, C. 2004. Medullary adrenergic neurons contribute to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive innervation of Thyrotropin-Releasing Hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research*. 1006: 1-7.
- 24.- Nakai, Y; Shioda, S; Ochiai, H; Kudo, J and Hashimoto, T. 1983. Ultrastructural relationship between monoamine- and TRH containing axons in the rat median eminence as revealed by combined autoradiography and immunocytochemistry in the same tissue section. *Cell Tissue Res*. 230: 1-14.
- 25.- Boudada, C; Szabó, K and Tasker, J. G. 1996. Physiological Mapping of Local Inhibitory Inputs to the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *J of Neuroscience*. 16: 7151-7160.
- 26.- Fekete, C; Wittmann, G; Liposits, Z and Lechan, R. M. 2002. GABAergic innervation of Thyrotropin-Releasing Hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res*. 957: 251-258.
- 27.- Hrabovszky, E; Wittmann, G; Turi, G. F; Liposits, Z and Fekete, C. Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone and Corticotropin-Releasing Hormone Neurons of the Rat contain Vesicular Glutamate Transporter-2. *Endocrinology*. 146: 341-347.
- 28.- Nicholas, A. P; Pieribone, V and Hokfelt, T. 1993. Distribution of mRNAs for alpha-2 adrenergic receptor subtypes in rat brain: an in situ hybridization study. *J. Comp Neurol*. 328: 575-594.
- 29.- Zhang, J-H; Sato, M. and Tohyama, M. 1991. Region-Specific Expression of the mRNAs Encoding  $\beta$ -subunits ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3) of GABA-A Receptor in the Rat Brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 303: 637-657.
- 30.- Araki, T; Sato, M; Kiyama, H; Manabe, Y and Tohyama. 1992. Localization of GABA-A Receptor  $\gamma$ 2-subunit mRNA-Containing neurons in the Rat Central Nervous System. *Neuroscience*. 47: 45-61.
- 31.- Wisden, W; Laurie, D. J; Monyer, H and Seeburg, P.H. 1992. The Distribution of 13 GABA-A Receptor Subunit mRNAs in the Rat Brain: Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon. *The Journal of Neuroscience*. 12: 1040-1062.

- 32.- Herman, J. P; Eyigor, O; Ziegler, D. R and Jennes, L. 2000. Expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 422: 352-362.
- 33.- Légrádi, G and Lechan, R. M. 1998. The nucleus arcuato is the major source for neuropeptide Y-innervation of Thyrotropin-Releasing Hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 139: 2362-2370.
- 34.- Légrádi, G and Lechan, R. M. 1999. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate Thyrotropin-Releasing Hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 140: 3643-52.
- 35.- Fekete, C; Légrádi, G; Mihály, E; Huang, Q-H; Jeffery, B; Rand, W; Emerson, C and Lechan, R. M. 2000.  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating is contained in nerve terminals innervating Thyrotropin-Releasing-Hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *The Journal of Neuroscience.* 20: 1550-1558.
- 36.- Broberger, C. 1999. Hypothalamic cocaine-and amphetamine-regulated transcript (CART) neurons: histochemical relationship to Thyrotropin-Releasing Hormone, melanin-concentrating hormone, orexin/hypocretin and neuropeptide Y. *Brain Research.* 848: 101-113.
- 37.- Fekete, C; Mihály, E; Luo, L. G; Kelly, J; Clausen, J. T; Mao, Q; Rand, W. M; Moss, L; Kuhar, M; Emerson, C; Jackson, M. D and Lechan, R. M. 2000. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript immunoreactive elements with Thyrotropin-Releasing Hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J of Neurosci.* 20: 9224-9234.
- 38.- Wittmann, G; Sarkar, S; Hrabovszky, E; Liposits, Z; Lechan, R. M and Fekete, C. 2004. Galanin- but not galanin-like peptide-containing axon terminals innervate hypophysiotropic TRH-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research.* 1002: 43-50.
- 39.- Uribe, R. M; Joseph-Bravo, P; Pasten, J; Ponce, G; Mendez, M; Covarrubias, L and Charli, J. L. 1991. Some events of Thyrotropin-Releasing Hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology.* 54: 493-498.

- 40.- Covarrubias, L; Uribe, R. M.; Mendez, M; Charli, J. L and Joseph-Bravo, P. 1988. Neuronal TRH synthesis: Developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochemical and biophysical research communications*. 151: 615-622.
- 41.- Segerson, T. P; Kauer, J; Wolfe, H. C; Mobtaker, H; Wu, P; Jackson, I. M. D. and Lechan, R. M. 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 238: 78-80.
- 42.- Koller, K. J; Wolff, R. S; Warden, M. K. and Zoelleer, R. T. 1987. Thyroid hormones regulate levels of Thyrotropin-Releasing Hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 84: 7329-7333.
- 43.- Kakucska, I.; Qi, Y and Lechan, R. M. 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic Thyrotropin-Releasing Hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 136. Pg: 2795-2802.
- 44.- Kondo, K.; Harbuz, M.S.; Levy, A and Lightman, S.L. 1997. Inhibition of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in response to lipopolysaccharide is independent of changes in circulating corticosteroids. *Neuroimmunomodulation*. 4: 188-94.
- 45.- Blake, N. G; Eckland, D. J; Foster, O. J. F. and Lightman, S. L. 1991. Inhibition of Hypothalamic Thyrotropin-Releasing Hormone Messenger Ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology*. 129: 2714-2718.
- 46.- Uribe, R. M; Redondo, J. L and Joseph-Bravo, P. 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 58: 140-145.
- 47.- Dyess, E. M; Segerson, T. P; Liposits, Z; Paull, W. D; Kaplan, M. M; Wu, P; Jackson, I. M. D. and Lechan, R. M. 1988. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of Thyrotropin-Releasing Hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 123. Pg: 2291-2297.
- 48.- Lechan, R. M; Jackson I. M and Mahdavi, V. 1994. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in Thyrotropin Releasing Hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 135: 92-100.
- 49.- Perez, L; Carreon, A and Gonzalez, M. E. 1998. Dexametasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interactions with cAMP pathway. *Neuroendocrinol*. 68: 345-354.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 50.- Cintra, A; Fuxe, K; Wikstom, A. C; Visser, T and 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 Research*. 506: 139-144.
- 51.- Guerra-Crespo, M; Ubieta, R; Joseph-Bravo, P; Charli, J. L y Perez-Martinez, L. 2001. BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur. J. Neurosci*. 14: 483-494.
- 52.- Cote-Velez A, Perez-Martinez L, Diaz-Gallardo MY, Perez-Monter C, Carreon-Rodriguez A, Charli JL, Joseph-Bravo P. 2005. Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *J. Mol Endocrinol*. 34: 177-197.
- 53.- Cole, R and Sawchenko, P.E. 2002. Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J of Neuroscience*. 22: 959-969.
- 54.- Van Haasteren G. A; Linkels, E; Klootwijk, W; van Toor, H; Rondeel J. M; Themmen, A. P; De Jong, F. H; Valentijn, K; Vaudry, H; and Bauer, K. 1995. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of Prothyrotrophin-Releasing Hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J of Endocrinol* 145: 143-53.
- 55.- Légrádi, G; Emerson, C. H; Ahima, S. H; Flier, J. S and Lechan, R. M. 1997. Leptin prevents fasting-induced suppression of Prothyrotropin-Releasing Hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 138: 2569-2576.
- 56.- Harris, M; Aschkenasi, C; Elias, C; Chandrankunnel, A; Nillni, E; Bjorbaek, C; Elmquist, J; Flier, J and Hollenberg, A. 2001. Transcriptional regulation of the Thyrotropin-Releasing Hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *Journal of Clinical Investigation*. 107: 111-120.
- 57.- Fekete, C; Kelly, J; Mihály, E; Sarkar, S; Rand, W. M; Légrádi, G; Emerson, C. H and Lechan, R. M. 2001. Neuropeptide Y Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis. *Endocrinology*. 142: 2606-2613.
- 58.- Fekete, C; Sarkar, S; Rand, W. M; Harney, J. W; Emerson, C. H; Bianco, A. C and Lechan, R. M. 2002. Agouti-Related Protein (AGRP) Has a Central Inhibitory Action on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis: Comparisons between the Effect of AGRP and Neuropeptide Y on Energy Homeostasis and the HPT Axis. *Endocrinology*. 143: 3846-3853.

- 59.- Kakucsca, I; Romero, L. I; Clark, B. D; Rondeel, J. M; Qi, Y; Alex, S; Emerson, C.H and Lechan, R. M. 1994. Suppression of Thyrotropin-Releasing Hormone Gene Expression by Interleukin-1-Beta in Rat: Implications for Nonthyroidal Illness. *Neuroendocrinology*. 59: 129-137.
- 60.- Fekete, C; Singru, P. S; Sarkar, S; Rand, W. M and Lechan, R. M. 2005. Ascending Brainstem Pathways are not involved in Lipopolysaccharides-Induced Suppression of Thyrotropin-Releasing Hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 146: 1357-1363.
- 61.- Cizza, G; Brady, L; Esclapes, M; Blackman, M; Gold, P and Chrousos, G. 1996. Age and Gender Influence Basal and Stress-Modulated Hypothalamic-Pituitary-Thyroidal Function in Fischer 344/N Rats. *Neuroendocrinology*. 64: 440-448.
- 62.- Rage, F; Lazaro J. B, Benyassi, A; Arancibia, S and Tapia-Arancibia, L. 1994. Rapid changes in somatostatin and TRH mRNA in whole rat hypothalamus in response to acute cold exposure. *J of Neuroendocrinol*. 6: 19-23.
- 63.- Arancibia, S; Tapia-Arancibia, L; Assenmacher, I and Astier, H. 1983. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology*. 37: 225-228.
- 64.- Jobin, M; Ferland, L; Côté, J and Labrie, F. 1975. Effect of exposure to cold on hypothalamic TRH activity and plasma levels of TSH and prolactin in the rat. *Neuroendocrinology*. 18: 204-212.
- 65.- Arancibia, S; Tapia, L. A and Astier, H. 1989. Physiological evidence for alpha-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neuroscience Letters*. 100: 169-174.
- 66.- Silvilotti, L and Nistri, A. 1991. GABA receptors Mechanisms in the Central Nervous System. *Progress in Neurobiology*. 36: 35-92.
- 67.- Niranjala, J. T, L; Medina-Kaue, L and Gibson, M. K 1995. Gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in mammalian neural and nonneural tissues. *Comp Biochem Physiol*. 112: 247-263.
68. - Guidotti, A; Corda, M. G; Wise, B. C and Costa, E. 1983. GABAERGIC SYNAPSES: Supramolecular Organization and Biochemical Regulation. *Neuropharmacology*. 22: 1471-1479.
- 69.- Paredes, R. G. and Anders A. 1992. GABA and Behavior: The role of Receptor Subtypes. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 16: 145-170.

- 70.- Pittaluga, A; Asaro, D; Pellegrini, G and Raitieri, M. 1987. Studies of <sup>3</sup>HGABA and endogenous GABA release in rat cerebral cortex suggest the presence of auto receptors of the GABA-B type. *Eur. J. Pharmacol.* 144: 45-52.
- 71.- Duttar, P and Nicoll, R. A. 1988. Pre- and postsynaptic GABA-B receptors in the hippocampus have different pharmacological properties. *Neuron.* 1: 585-591.
- 72.- Sieghart, W. 2000. Unraveling the function of GABA-A receptor subtypes. *Current Awareness (TiPS).* 21: 411-413
- 73.- Sieghart, W; Fuchs, K; Tretter, V; Ebert, V; Jechlinger, M; Höger, H and Adamiker, D. 1999. Structure and subunit composition of GABA-A receptors. *Neurochem Int.* 34: 379-385.
- 74.- Möhler, H. *Arzneim-Forsch.* 1992. GABAergic Synaptic Transmission. Regulation by drugs. *Drug Res.* 42: 211-214.
- 75.- DiScala, G; Schimitt, P and Karli, P.1984. Flight induced by infusion of bicuculline methiodide into periventricular structures. *Brain Res.* 309: 199-208.
- 76.- Joy, R. M; Albertson, T. E and Stark, L. G.1984. An analysis of the actions of progabide, a specific GABA receptor agonist, on kindling and kindled seizures. *Exp Neurol.* 83: 144-154.
- 77.- Brooks-Kayal, A. R; Jin, H; Price, M and Dichter, M. A. 1998. Developmental expression of GABA-A receptor subunit mRNAs in individual hippocampal neurons. *J of Neurochem.* 70: 1017-1028.
- 78.- Davis, A. M; Penschuck, S; Fritschy, J-M and McCarthy, M. M. 2000. Developmental switch in the expression of GABA-A receptor subunits  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 in the hypothalamus and limbic system of the rat. *Developmental Brain Research.* 119: 127-138.
- 79.- Fénelon, V. S. and Herbison, A. E. 1996. *In vivo* Regulation of Specific GABA-A Receptor Subunit Messenger RNAs by Increased GABA Concentrations in Rat *Brain Neuroscience.* 71: 661-670.
- 80.- Jones, K. A; Borowsky, B; Tamm, J. A; Craig, D. A; Durkin, M. M; Dai, M; Yao, W-J; Johnson, M; Gunwaldsen, C; Huang, L-Y; Tang, C; Shen, Q; Salon, J. A; Morse, K; Laz, T; Smith, K. E; Nagarathnam, D; Noble, S. A; Branchek T. A and Christophe, G. 1998. GABA-B receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA-BR1 and GABA-BR2. *Nature.* 396: 674-678.
- 81.- Margenta-Mitrovic, M; Mitrovic, I; Riley, R. C; Jan, L. Y and Basbaum, A. I. 1999. Immunohistochemical Localization of GABA-B Receptors in the Rat Central Nervous System. *The Journal of Comparative Neurology.* 405: 299-321.

- 82.- Lux-Lantos, V; Becú-Villalobos, D; Bianchi, M; Rey-Roldán, E; Chamson-Reig, A; Pignataro, O and Libertun, C. 2001. GABA-B receptors in anterior pituitary cells: Mechanisms of action coupled to endocrine effects. *Neuroendocrinology*. 73: 334-343.
- 83.- Enz, R and Cutting G. R. 1998. Molecular composition of GABA-C receptors. *Vision Reseach*. 38: 1431-1441.
- 84.- Boue-Grabot, E; Taupignon, A; Tramu, G and Garret, M. 2000. Molecular and Electrophysiological evidence for a GABA-C receptor in Thyrotropin-Secreting Cells. *Endocrinology*. 141: 1627-1633.
- 85.- Chebib, M. and Johnston, G. AR. 1999. The ABC of GABA Receptors: A Brief Review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 26: 937-940.
- 86.- Bormann, J. 2000. The ABC of GABA receptors. *TiPS*. 21: 16-19.
- 87.- Herman, J. P and Cullinan, W. E. 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci*. 20: 78-84.
- 88.- Bali, B and Kóvacs, K. J. 2003. GABAergic control of neuropeptide gene expression in parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *European J. of Neuroscience*. 18: 1518-1526.
- 89.- Bartanusz, V; Muller, D; Gaillard, R. C; Streit, P; Vutskits and Kiss, J. Z. 2004. Local  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamate circuit control of hypophyseotropic corticotropin-releasing factor neuron activity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *European J. of Neuroscience*. 19: 777-782.
- 90.- Cullinan, W. E. 2000. GABA-A Receptor Subunit Expression within Hypophysiotropic CRH neurons: A dual Hybridization Histochemical Study. *The Journal of Comparative Neurology*. 419: 344-351.
- 91.- Herman, J. P; Mueller, N. K. and Figueiredo, H. 2004. Role of GABA and Glutamate Circuitry in Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Stress Integration. *Annals New York Academy of Sciences*. 1018: 35-45.
- 92.- Kovács, K. J; Miklós, I. H. and Bali, B. 2004. GABAergic Mechanisms constraining the activity of the Hypothalamus-pituitary- Adrenocortical Axis. *Annals New York Academy of Sciences*. 1018: 466-476.
- 93.- Kovács, K. J and Sawchenko, P. E. 1996. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neurosci*. 16: 262-273.

- 94.- Herman, J; Cullinan, W. E; Ziegler, D. R and Tasker, J. G. 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *European Journal of Neuroscience*. 16: 381-385.
- 95.-Herman, J. P; Tasker, J. G; Ziegler, D. R. and Cullinan, W. 2002. Local circuit regulation of paraventricular nucleus stress integration Glutamate-GABA connections. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 71: 457-468.
- 96.- Herman, J. P; Figueiredo, H; Mueller, N. K; Ulrich-Lai, Y; Ostrander, M. M; Choi, D. C and Cullinan, W. E. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamus-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 24: 151-180.
- 97.- Givalois, L; Songyun, L and Pelletier, G. 2002. Central nitric oxide regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult male rats. *Molecular Brain Research*. 102: 1-8.
- 98.- Stern, J. E. 2004. Nitric oxide and homeostatic control: an intercellular signaling molecule contributing to autonomic and neuroendocrine integration?. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 84: 197-215.
- 99.- De-Pei, L; Shao-Rui, C; Finnegan, T. F. and Hui-Lin, P. 2003. Signaling pathway of nitric oxide in synaptic GABA release in the rat paraventricular nucleus. *J. Physiol*. 554: 100-110.
- 100.- Zhang, K and Patel, K. P. 1998. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. *Am. J. Physiol*. 275: 728-734.
- 101.- Mattila, J and Männistö. 1980. Modification of GABAergic Activity and Thyrotropin Secretion in Male Rats. *Acta Pharmacol and Toxicol*. 47: 241-248.
- 102.- Mattila, J. 1981. Studies on the Mechanism of the GABAergic Inhibition of TSH Secretion in Male Rats. *Acta Pharmacol and Toxicol*. 48: 320-325.
- 103.- Jordan, C; Poncet, C; Veisseire, M. and Mornex, R. 1983. Role of GABA in the Control of Thyrotropin Secretion in the Rat. *Brain Research*. 268: 105-110.
- 104.- McCann, S. M; Vijayan, E; Negro-Vilar, A; Mizunuma, H and Mangat, H. 1984. Gamma Aminobutyric Acid (GABA), a modulator of Anterior Pituitary Hormone Secretion by Hypothalamic and Pituitary Action. *Psychoneuroendocrinology*. 9: 97-106.
- 105.- Makinen, M; Ahtee, L; Rosenqvist, K; Tuominen, K and Mannisto, P. 1993. Effects of intraventricular taurine, homotaurine and GABA on serum prolactin and thyrotropin levels in female and in male rats. *Journal of Neural Transmission*. 94: 155-163.

- 106.- Paxinos, G and Watson C. 1986. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. 2da edición, Academic Press Inc.
- 107.- Palkovits, M and Brownstein, M. J. 1988. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier Science Publishing Co, Inc.
- 108.- Chomczynski, P and Sacchi, N. 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. 162: 156-159.
- 109.- Sanchez, E; Uribe, R. M; Corkidi, G; Zoeller, T. R; Cisneros, M; Zacarias, M; Morales-Chapa, C; Charli, J-L and Joseph-Bravo, P. 2001. Differential Responses of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Neurons to Cold exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 74: 407-422.
- 110.- Garcia, S. I; Alvarez, A. L; Porto, P. I; Garfunkel, V. M; Finkielman, S and Pirola, C. J. 2001. Antisense Inhibition of Thyrotropin-Releasing Hormone Reduces Arterial Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 37: 365-370.
- 111.- Yann-Lee, T and Jenn-Tser, P. Involvement of central GABAergic neurons in basal and diurnal changes of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion. *Life Sciences*. 68: 1965-1975.
- 112.- Joseph-Bravo, P; Charli, JL; Palacios, JM; and Kordon, C. 1979. Effect of neurotransmitters on the *in vitro* release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. 104: 801-806.
- 113.- Martinez de la Escalera, G and Weiner, R. D. 1992. Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrine Reviews*. 13: 241-255.
- 114.- Ben-Jonathan, N and Hnasko, R. 2001. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*. 22: 724-763.
- 115.- Osaka, T. 2004. Cold-induced Thermogenesis mediated by GABA in the preoptic area of anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 10: 1-25.
- 116.- Sakamaki, K; Nomura, M; Yamato, K and Tanaka, J. 2004. GABA-mediated attenuation of noradrenaline release in the rat median preoptic area caused by intravenous injection of metamaminol. *Auton Neurosci*. 111: 7-14.
- 117.- Wittman, G; Lechan, R. M; Liposits, Z and Fekete, C. 2005. Glutamatergic innervation of Corticotropin- Releasing Hormone and Thyrotropin- Releasing Hormone synthesizing

Neurons in the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of the rat. *Brain Research*. 1039: 53-62.

118.- Borsook, D; Smirnova, O; Behar, S; Lewis, L. A and Kobierski, A. 1999. PhosphoCREB and CREM/ICER: positive and negative regulation of proenkephalin gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J. Mol. Neurosci*. 12: 35-51.

119.- Shepard, J; Liu, Y; Sassone-Corsi, P and Aguilera, G. 2005. Role of Glucocorticoids and cAMP- Mediated Repression in limiting Corticotropin-Releasing Hormone Transcription during Stress. *J. of Neurosci*. 25: 4073-4081.

120.- Connolly, C; Kittler, F; Thomas, P; Uren, J. M; Brandon, N; Smart, T and Moss, S. 1999. Cell surface stability of  $\gamma$ -Aminobutyric acid type A receptors: dependence of protein kinase C activity and subunit composition. *J. Biol Biochem*. 274: 36565-72.

## **ANEXO 1**

### **GELATINIZACION DE LAMINILLAS**

- 1.-Lavar brevemente las laminillas con agua destilada y etanol absoluto.
- 2.-Ecurrir a TA durante 3 h.
- 3.-Hornear las laminillas en el horno a 180 °C, toda la noche (protegidas del polvo con papel aluminio).
- 4.-Preparar gelatina (piel de cisne tipo II, sigma 0.65% y sulfato de cromo y potasio 0.05%) con agua previamente precalentada a 42 °C y filtrada con una unidad de filtración 0.45µm.
- 5.-Sumergir las laminillas en la gelatina precalentada a 45 °C durante 15 min, cuidando que las laminillas no se peguen entre si.
- 6.-Secar a TA(sobre servitoallas y protegidas del polvo con papel aluminio).
- 7.-Hornear a 37 °C durante 12 h (protegidas del polvo con papel aluminio).
- 8.-Una vez gelatinizadas las laminillas, estas se sumergieron durante 45 min en una solución de poli-L-lisina 0.005% (grado de polimerización 350,000) preparada en Tris 0.1M, pH 8.
- 9.-Secar a TA.
- 10.- Hornear a 37 °C durante 12 h.

## **ANEXO 2**

### **MICROAUTORADIOGRAFIA**

- 1.-En completa oscuridad, fundir la emulsión fotografica (Kodak) en baño maria previamente precalentado a 45°C durante 15min.
- 2.-Vaciar la emulsión en una copa pequeña de vidrio e introducir por 5seg cada laminilla.
- 3.-Ecurrir el exceso de emulsión, colocar y mantener las laminillas en posición horizontal durante 3h a TA. Una vez secas, almacenar las laminillas en cajas de plastico negras, envolver individualmente las cajas con papel aluminio y guardar a 4°C durante 15 días en bolsas negras que contengan silica gel como desecador.
- 4.-Para revelar es necesario mantener las laminillas a temperatura ambiente al menos durante 3 h. Tiempo durante el cual se preparan las siguientes soluciones:  
Revelador Kodak D19 15.6 % a 52°C.  
Fijador GBX 21.8% a TA.  
Antes de iniciar todas las soluciones deberán estar a 15°C.
- 5.-Sumergir las laminillas por 3 min en revelador D-19 (Kodak).
- 6.-Sumergir las laminillas por 1min en agua.
- 7.-Sumergir dos veces 5min c/u en fijador GBX.
- 8.-Sumergir las laminillas por 15min en agua con agitación suave.

## **ANEXO 3**

### **TINCION DE LOS TEJIDOS**

- 1.-Sumergir por 2 min en hematoxilina de Harris (sigma) e inmediatamente enjuagar con agua para eliminar el exceso de colorante.
- 2.-Deshidratar por 2 min en cada uno de los siguientes alcoholes: 50, 70, 80, 95 y 100%.
- 3.-Sumergir en xilol dos veces por 5 min c/u,
- 4.- Montar los tejidos, colocando una gota de medio de montaje Cytoseal 60 (Stephens Scientifics) y un cubreobjetos sobre el tejido inmediatamente después de sacarlo del xilol.