



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Localización de los ARNm del receptor tipo 1 de
TRH y de la piroglutamil peptidasa II
en el septum de rata**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A

ERICK ARIEL MARTÍNEZ CHÁVEZ



Dirección de Tesis:
DR. JEAN-LOUIS CHARLI CASALONGA

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El concluir esta tesis representa un esfuerzo llevado a cabo no solo por mí, sino también, por diversas personas e instituciones que me ayudaron en forma directa o indirecta a realizarla. Por lo tanto, es forzoso para mí agradecerles en la forma mas sincera el apoyo que me brindaron.

Inicialmente agradezco a mi madre y a mi abuela por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, sin el cual seguramente no estaría donde me encuentro el día de hoy.

También agradezco al Dr. Jean-Louis Charli Casalonga por el simple hecho de aceptarme en su laboratorio. Por haberme apoyado académicamente y en otros aspectos en los cuales probablemente muchos otros tutores no lo hubieran hecho. Por haberme dado una gran libertad de trabajo y finalmente por su esmero en revisar y evaluar esta tesis.

A la Dra. Rosa María Uribe Villegas por brindarme su amistad y apoyo en el aspecto académico. Por haberme ayudado y asesorado en el aspecto experimental, como seguramente nadie más volvera a hacerlo. Por haber puesto un gran esfuerzo en la revisión y evaluación de esta tesis y finalmente por enseñarme que existen personas genuinamente comprometidas con la educación de un estudiante.

Adicionalmente quiero agradecer al Dr. Ignacio López González, al Dr. Julio Morán Andrade y a la M. en IBB. Claudia Segal Kischinevzki por haber formado parte del comité académico que revisó y evaluó este trabajo.

Por otro lado agradezco a la Quim. Fidelia Romero Arteaga por brindarme asistencia técnica en la purificación de los plásmidos utilizados y al Sr. Sergio Gonzalez Trujillo del Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, por proveerme de las pobres ratas que sucumbieron en el presente estudio.

Finalmente quiero agradecer a la UNAM por ofrecerme educación de calidad sin lucro alguno y al CONACYT por aportar los fondos (no. 61804) utilizados.

ÍNDICE

ABREVIACIONES DE LAS REGIONES UTILIZADAS	4
RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1. Receptores del TRH	8
1.2. Degradación del TRH	10
2. ANTECEDENTES	13
2.1. El TRH y su efecto analéptico	13
2.2. Organización del septum	15
2.2.1 <i>Regiones</i>	15
2.2.2 <i>Fenotipos neuronales</i>	16
2.2.3 <i>Eferentes</i>	18
2.2.4 <i>Aferentes del septum</i>	20
2.2.5 <i>Distribución de TRH, TRHRs y PPII en el septum</i>	21
2.2.5.1. <i>Complejo del septum medio-banda diagonal de Broca</i>	22
2.2.5.2. <i>Septum lateral</i>	22
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	24
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	24
6. MATERIALES Y MÉTODO	25
6.1. Tratamiento del material y agua	25
6.2. Plásmidos utilizados	25
6.3. Transcripción <i>in vitro</i> con digoxigenina-UTP	26
6.4. Determinación de la eficiencia de transcripción con UTP-digoxigenina	27
6.5. Transcripción <i>in vitro</i> con ³⁵ S-UTP	28
6.6. Determinación del porcentaje de incorporación y actividad específica del transcrito marcado con UTP- ³⁵ S	29
6.7. Hidrólisis alcalina de los transcritos	30
6.8. Obtención de las rebanadas de cerebro	31
6.9. Preparación de los tejidos antes de la hibridación	31
6.10. Hibridación <i>in situ</i>	32

6.11. Lavados de post-hibridación y preparación de los cortes para revelado de la señal radioactiva o de color	33
6.12. Revelado de sonda marcada con ³⁵ S	34
6.12.1. Macroautoradiografía. Exposición a la película autoradiográfica	34
6.12.2. Microradiografía. Exposición a emulsión fotográfica	34
6.13. Revelado del color	35
6.14. Tinción y montaje de los tejidos	35
6.15. Doble hibridación <i>in situ</i>	36
6.16. Análisis de la señal	36
7. RESULTADOS	38
7.1. Implementación de la hibridación <i>in situ</i>	38
7.2. Distribución del ARNm del TRHR1	39
7.3. Distribución del ARNm de la PPII	41
7.4. Colocalización de los ARNm de la PPII y del TRHR1	44
8. DISCUSIÓN	49
8.1. Distribución del ARNm del TRHR1 vs ensayos de unión de TRH a sus receptores	49
8.2. Distribución comparativa de los ARNm de TRHR1 y PPII	52
8.3. Significado funcional y regulación del TRH en el septum	53
8.3.1. Efecto y regulación en el MSDBB	54
8.3.2. Efecto y regulación en el septum lateral	58
9. CONCLUSIÓN	61
10. REFERENCIAS	62

ABREVIACIONES DE LAS REGIONES UTILIZADAS

BNST	Núcleo de la estría terminal
CA1	Cuerno de Ammon 1
CA2	Cuerno de Ammon 2
CA3	Cuerno de Ammon 3
DBB	Banda diagonal de Broca
GrDG	Giro dentado, parte granular
hDBB	Banda diagonal de Broca, parte horizontal
LS	Septum lateral
LSD	Septum lateral, parte dorsal
LSI	Septum lateral, parte intermedia
LSV	Septum lateral, parte ventral
MS	Septum medio
MSDBB	Complejo del septum medio-banda diagonal de Broca
MSvDBB	Complejo del septum medio-banda diagonal de Broca, parte vertical
PVN	Núcleo paraventricular del hipotálamo
Sfi	Núcleo septo-fimbrial
Shi	Núcleo septo-hipocampal
Shy	Núcleo septo-hipotalámico
vDBB	Banda diagonal de Broca, parte vertical

RESUMEN

El septum es una región del sistema límbico que recibe y envía proyecciones neuronales a áreas telencefálicas y diencefálicas y en menor extensión con el mesencéfalo, tallo bajo del cerebro y regiones de la espina dorsal. El septum está relacionado con el control de una variedad de procesos fisiológicos y de comportamiento relacionadas con funciones cognoscitivas. Diferentes evidencias han demostrado que la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) puede modular muchos de estos procesos, por lo que se han realizado varios estudios que localicen a sus receptores, así como a la enzima específica encargada de su degradación, la piroglutamil peptidasa II (PPII). La falta de anticuerpos específicos contra estos elementos ha provocado que se obtenga información de su localización identificando los sitios de expresión de los mensajeros de sus ácidos ribonucleicos (ARNm) para después hacer una extrapolación de la posible localización de su producto proteico. En particular, estos estudios han sido poco descriptivos en los núcleos septales y aunque han sugerido la colocalización de la PPII y del receptor del TRH en ciertos de ellos, nunca se ha comprobado. Por lo tanto, este estudio describe en forma fina la distribución de los ARNm de la PPII y del receptor tipo 1 del TRH (TRHR1) a lo largo del septum de rata y posteriormente refiere al patrón de colocalización de dichos mensajeros a lo largo del mismo. En esta forma, se encontraron concentraciones elevadas de ARNm de TRHR1 en el núcleo septohipocampal, en la banda diagonal de Broca (con mayor densidad en su parte vertical) y en el septum lateral. Las concentraciones elevadas de mensajero sólo se presentaron en rangos estrechos de bregma (2.20 mm a 1.76 mm, 1.30 mm a 1.12 mm, - 0.12 mm a - 0.22 mm respectivamente) y no en todo el núcleo. El ARNm de la PPII demostró concentraciones elevadas en el septum lateral y núcleos aledaños como el núcleo septofimbrial y septohipotalámico en un rango de bregma de - 0.14 mm a - 0.20 mm. Adicionalmente, la colocalización de los ARNm fue positiva virtualmente en todas las regiones antes mencionadas; siendo los mismos rangos de bregma los sitios de mayor colocalización. Los datos presentes sugieren zonas discretas de control TRHérgico mediado por el TRHR1, así como su regulación por medio de la hidrólisis del TRH mediante la PPII. Lo anterior indica que en el septum de rata, el TRH puede modular procesos fisiológicos, como la narcolepsia, por medio de la regulación de substratos neuronales que tienen una localización muy estrecha.

1. INTRODUCCIÓN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido con secuencia pGlu-His-ProNH₂ que funge como regulador endocrino y neurotransmisor (O'Leary y O'Connor 1995) conservado en vertebrados e invertebrados, incluyendo a los animales que no tienen glándula tiroidea (Jackson y Reichlin 1974, Grimm-Jorgensen *et al.*, 1975).

Este tripéptido se descubrió y caracterizó químicamente en el hipotálamo de puercos y ovejas (Schally *et al.* 1969, Burgus *et al.* 1970) y se nombró en base a la acción hipofisiotrófica de regular la liberación de la hormona estimuladora de la tiroides o tirotropina (TSH) de la parte anterior de la glándula pituitaria. El TRH está enriquecido en regiones del sistema nervioso central (SNC) como la amígdala, el hipotálamo, el hipocampo, por nombrar algunas, y también se puede encontrar en regiones externas al SNC, como el páncreas, el tracto gastrointestinal, la retina, tejidos reproductivos como la placenta, los ovarios, los testículos, las vesículas seminales, la próstata, la retina y elementos sanguíneos (Lechan 1993, O'Leary y O'Connor 1995). Esta amplia distribución dentro y fuera del sistema nervioso central apoya los diversos roles en que se ha involucrado a esta molécula.

Las funciones del TRH son muy variadas. En el SNC se ha propuesto como neuromodulador o neurotransmisor (Dettmar y Metcalf 1981), debido a que su liberación se lleva a cabo por medio de exocitosis y a que tiene receptores específicos. El TRH se libera en respuesta a una amplia gama de estímulos fisiológicos o farmacológicos como el frío, la succión de la mama de la madre por parte de las crías, la presencia de depresivos como el etanol y los barbitúricos (Nillni y Sevarino 1999, Gary *et al.* 2003). Regula la ingesta de agua y comida, el ciclo circadiano, el estado de ánimo, la percepción del dolor, funciones sensoriales, locomotoras, cardiovasculares, el aprendizaje, la memoria, la respiración, ansiedad, etc. (Horita 1998, Nillni y Sevarino 1999, Gutiérrez-Mariscal *et al.* 2007). Debido a ello, se han hecho estudios clínicos para probar al TRH como tratamiento contra varias enfermedades, como estados depresivos, esquizofrenia, esclerosis lateral amiotrófica y degeneración espinocerebelar (Griffiths 1986).

El TRH tiene una biodisponibilidad baja y su vida media en el plasma es de 5 minutos (Gary *et al.* 2003). Por lo tanto, y con el fin de obtener los efectos benéficos del TRH

por un tiempo más prolongado, se ha invertido tiempo y recursos en el desarrollo de análogos del TRH que tengan una vida media mayor y una mayor afinidad por su receptor (Horita 1998).

De los diversos efectos fisiológicos del TRH, el mejor conocido es el hipofisiotrópico. En el hipotálamo, el TRH es sintetizado en el núcleo paraventricular (PVN), de donde viaja a la eminencia media para ser liberado al sistema portal que irriga a la adenohipófisis, donde estimula la síntesis y secreción de TSH de la pituitaria anterior (Haisenleder *et al.* 1992). Esta, a su vez estimula la biosíntesis y liberación de triiodotironina (T3) y tiroxina (T4) (Nillni y Sevarino 1999) en la tiroides. Adicionalmente, el TRH influye en la liberación de otras hormonas, como la prolactina, la hormona del crecimiento, la vasopresina y la insulina (Bowers *et al.* 1971, Wilber y Utiger 1968, Takahara *et al.*, 1974).

El TRH se sintetiza a partir de un precursor de 29-kDa llamado prepro-TRH, que posteriormente es modificado en forma postraducciona para generar al TRH (Nillni y Sevarino 1999). El preproTRH es codificado por un gen compuesto por 3 exones separados por 2 intrones. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida, el exón 2, para el péptido señal y una pequeña porción del amino terminal, y el exón 3 codifica para casi todo el pro-TRH (Lee *et al.* 1988). La región que flanquea al extremo 5' del gen contiene la región promotora que incluye varios elementos regulatorios consenso: dos mitades de sitios individuales que se unen al receptor de hormona tiroidea (TR) como monómero y una tercera región que se une al homodímero TR y al heterodímero TR con proteínas auxiliares (Hollenberg *et al.* 1995); un sitio consenso de unión al receptor de glucocorticoides (GR) y dos elementos de respuesta a AMPc imperfectos (CREs), de los cuales uno es reconocido por AP1 y puede unir al TR (Stevenin y Lee 1995).

El prepro-TRH contiene una secuencia N-terminal líder de 25 aminoácidos, 5 secuencias repetidas Gln-His-Pro-Gly en rata y 6 en humano, flanqueadas por residuos dibásicos (Lys-Arg o Arg-Arg), 4 ó 5 péptidos no-TRHérgicos entre los progenitores del TRH, un péptido que flanquea la secuencia líder N-terminal y un péptido C-terminal (Lechan *et al.* 1986). Su procesamiento comienza con la traducción ribosomal de su ARNm y la remoción del péptido señal al momento de ingresar al lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) para generar al pro-TRH de 26-kDa. Este producto es

modificado en la ruta de secreción regulada (RSP) por las proteasas de serina de la familia de las convertasas de prohormonas, PC1 y PC2 (Nillni y Sevarino 1999) y es transportado de la red del *trans*-Golgi (TGN) a los gránulos secretores inmaduros (ISGs) (Cruz y Nillni 1996). Las proteasas PC1 y PC2 hidrolizan los enlaces peptídicos adyacentes a los residuos dibásicos y estos son removidos por la carboxipeptidasa E (CPE) (Nillni y Sevarino 1999) dejando como producto Gln-His-Pro-Gly. Posteriormente, la peptidil-glicina monooxigenasa α -amida (PAM) hidroliza a la Gly para dejar un grupo amida en el extremo C-terminal (Prigge *et al.* 2000) y el residuo Gln cicliza (pGlu) por medio de la glutaminil ciclasa, obteniendo como producto final al TRH y 7 péptidos no-TRHérgicos en la rata. Dichos productos son almacenados en la célula dentro de los gránulos de secreción maduros (MSGs), y son liberados por medio de exocitosis en respuesta a estímulos nerviosos u hormonales (Nillni y Severino 1999). Los péptidos no TRHérgicos se denominaron péptidos crípticos debido a que su función era desconocida. Diversos estudios han demostrado que dichos péptidos poseen funciones variadas, que pueden ser similares a las del TRH *per se*, como estimular la expresión del gen de TSH e inducir la síntesis y liberación de prolactina (Carr *et al.* 1992). En el lado opuesto, estos péptidos también han demostrado efectos contrarios al TRH, como inhibir la secreción de la prolactina de la pituitaria anterior (Alexander *et al.* 2002) o antagonizar la secreción de la hormona del crecimiento (Harvey y Cogburn 1996)

1.1. Receptores del TRH

Las células blanco del TRH se encuentran principalmente en el cerebro y en la adenohipófisis. La señalización celular del TRH está mediada por lo menos por dos subtipos de receptores de la familia de receptores rodopsina/ β -adrenergicos, del grupo de la superfamilia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs) (Sun *et al.* 2003); denominados TRHR1 y TRHR2. Estos receptores se encuentran localizados principalmente (95% de ellos) en la materia gris (Mantyh y Hunt 1985), siendo el bulbo olfatorio accesorio, el hipocampo ventral y la amígdala los lugares con mayor concentración de receptores en todo el cerebro de la rata (Manaker *et al.* 1985, Mantyh y Hunt 1985). En la mayoría de los casos no hay una correlación entre la localización del TRH y sus receptores. Áreas como el giro dentado, la amígdala y el cuerno dorsal de la espina dorsal presentan altos niveles de receptores, pero bajos de TRH, mientras que

el hipotálamo, el estriatum y el cuerno ventral de la espina dorsal muestran el caso contrario (Manaker *et al.* 1985).

El ARNm del TRHR1 se expresa predominantemente en regiones endócrinas como la parte anterior de la pituitaria, el núcleo arcuato, el núcleo anterior del hipotálamo y el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), mientras que el ARNm del TRHR2 se detecta principalmente en áreas importantes para la transmisión de señales somatosensoriales y funciones importantes del SNC como en la corteza cerebral, la corteza cerebelar y el tálamo (Heuer *et al.* 2000).

La secuencia de aminoácidos de los receptores del TRH es muy conservada filogenéticamente. El TRHR1 de humano tiene un 90.3% y un 89.2% de similitud con el del ratón y de la rata respectivamente. El nivel de conservación de aminoácidos de los receptores de estos roedores es de 95%. Adicionalmente, en una misma especie, los dos receptores del TRH presentan un 50% de similitud (Sun *et al.* 2003). Entre las diferencias que presentan ambos receptores entre sí, destacan su distribución específica, la conformación que asumen al unirse al TRH, la actividad basal de señalización, propiedades de internalización y estructura primaria (Sun *et al.* 2003).

La unión del TRH a su receptor desencadena una cascada de señalización y una subsiguiente internalización del mismo. El proceso de internalización es dependiente de la secuencia de motivos en su C-terminal (Nussenzveig *et al.* 1993), así como de secuencias dentro de su segunda o tercera región transmembranal y debe ser mediado por vesículas cubiertas con clatrina, como es el caso de otros GPCRs (Ashworth *et al.* 1995). La mayor parte de los receptores internalizados son degradados en los lisosomas y la renovación se hace por la síntesis *de novo* de receptores; sin embargo, se ha demostrado que también ocurre reciclaje de los receptores más jóvenes hacia la membrana celular (Cook y Hinkle, 2004). En esta forma, el proceso de internalización disminuye el número de los receptores presentes en la membrana celular, regulando la señalización del TRH (Sun *et al.* 2003).

En cuanto al proceso de señalización, la unión del TRH a su receptor provoca la activación de la fosfolipasa C, que a su vez estimula la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-P2 (PIP2) para generar inositol 1,4,5-trifosfato (InsP3) y 1,2-diacilglicerol (DAG). El IP3 actúa en receptores a IP3 localizados en el retículo endoplasmático, produciendo

la liberación al citosol de calcio intracelular y una subsiguiente activación de la proteína cinasa C (PKC) (Hsieh y Martin 1992). Adicionalmente, la activación de los TRHRs estimula a la proteína cinasa dependiente de calcio/cadmodulina (Ca^{2+} /CamKin) (Cui *et al.* 1994) y a la MAPK (Ohmichi *et al.* 1994). La activación de la PKC induce la expresión génica en parte vía el factor transcripcional proteína activadora 1 (AP-1) (Sun *et al.* 2003) y la Ca^{2+} /CamKin debe inducir la transcripción génica por medio del CRE (Andrisani *et al.* 1999).

Finalmente, cabe destacar que los receptores del TRH son regulados negativamente por el TRH, agentes que modulen los niveles de AMPc y hormonas tiroideas en la adenohipófisis (Gershengorn y Osman 1996).

1.2. Degradación del TRH

El TRH es resistente a la degradación por exopeptidasas debido a que su amino y carboxilo terminal están bloqueados y es resistente a la degradación por endopeptidasas generales debido a un residuo de prolina interno (O'Leary y O'Connor 1995). Sin embargo, el TRH es inestable en el suero y en los homogenados de tejidos debido a la presencia de peptidasas específicas.

Existen cuatro enzimas que pueden degradar al TRH *in vitro* (Cummins y O'Connor 1998). La piroglutamil aminopeptidasa I (PPI), la piroglutamil aminopeptidasa II (PPII) y la tiroliberinasas (una forma de la PPII soluble en suero y sintetizada en el hígado) (Schmitmeier *et al.* 2002), que generan al His-Pro-NH₂, el cual puede ciclar a un metabolito estable llamado His-Pro-dicetopiperazina (DKP) (Yanagisawa *et al.* 1980) y la prolil endopeptidasa (PE), que genera TRH-OH (Cummins y O'Connor 1998). La PPI, la PPII y la PE son las enzimas que metabolizan al TRH en extractos del SNC (Kelly 1995), mientras que la tiroliberinasas degrada al TRH en el suero y en otros tejidos periféricos (Taylor y Dixon 1978, Bauer y Nowak 1979).

La PPI es una proteasa de cisteína soluble que remueve el residuo N-terminal pGlu del TRH (Kelly 1995). Sin embargo, no es específica del TRH, ya que también hidroliza péptidos como la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), la neurotensina (NT) y la bombesina (Nillni y Sevarino 1999). Se ha demostrado que esta enzima no juega un papel importante en la degradación del TRH *in vivo*, debido a que

se encuentra en el citoplasma, mientras que el TRH se localiza en vesículas y no hay evidencias de que pueda ser liberada al espacio extracelular (Mendez *et al.* 1990, Charli *et al.* 1987).

La PE es una proteasa de serina citosólica de 70 kDa que corta en el lado carboxilo del residuo de prolina del TRH para generar TRH-OH (Kelly 1995). Al igual que la PPI, esta enzima no parece degradar al TRH *in vivo* (Mendez *et al.* 1990, Charli *et al.* 1987) y tampoco es específica del TRH, ya que hidroliza otros neuropéptidos como el LHRH, la NT y la sustancia P (Nillni y Sevarino 1999). Tanto la PPI como la PE se encuentran muchas veces presentes en los mismos tejidos; por lo tanto, pueden generar DKP y/o TRH-OH a partir del TRH *in vitro* (Nillni y Sevarino 1999).

Por su parte, la PPII, es una ectoenzima de 230 kDa con características de una zinc metalopeptidasa que pertenece a la familia M1, es inhibida por queladores metálicos (Czekay y Bauer 1993), tiene un pH óptimo neutro y una K_m de 40 μ M (O'Connor y O'Quinn 1985). A diferencia de la PPI y la PE, la PPII ha sido propuesta como el principal elemento de inactivación del TRH *in vivo* debido a varias evidencias que apoyan este hecho: Está distribuida ampliamente en el SNC, tiene una alta especificidad por el TRH (Wilk y Wilk 1989, Elmore *et al.* 1990), está presente principalmente en neuronas (Cruz *et al.* 1991), concentrada en el sinaptosoma (O'Connor y O'Quinn 1984), con su sitio activo dirigido hacia el espacio extracelular (Charli *et al.* 1988); finalmente, al inhibirla se provoca un aumento en la recuperación de TRH liberado al medio extracelular en el SNC (Charli *et al.* 1989). En la adenohipófisis, la PPII se localiza preferentemente en lactótrofos (Bauer *et al.* 1990), donde su actividad es regulada por el TRH, aparentemente por medio de la activación de la PKC (Vargas *et al.* 1994), por hormonas tiroideas y esteroideas (Bauer 1987, Ponce *et al.* 1988) y por otros factores hipotalámicos (Charli *et al.* 2006). Recientemente, se ha demostrado que las hormonas tiroideas modulan la actividad y la síntesis de la PPII en los tanicitos, sugiriendo que esta enzima puede contribuir en la regulación del TRH liberado de la eminencia media (ME) (Sánchez *et al.* 2009). En cambio, hasta la fecha no se ha demostrado que el 17β estradiol regule la actividad o síntesis de la PPII en el cerebro (Bauer *et al.* 1987, Ponce *et al.* 1988). Hay evidencias de que la actividad de la PPII en el cerebro puede ser regulada en forma negativa por el etanol (de Gortari *et al.* 2005) y en forma positiva en ratas durante el establecimiento de epilepsia experimental "kindling" (de Gortari *et al.* 1995).

La especificidad de la PPII por el TRH radica en que sólo puede hidrolizar péptidos con estructura Glp-X-Pro-NH₂ (siendo X preferentemente aminoácidos aromáticos neutros) (Kelly *et al.* 2000), Glp-His-Y (siendo Y varios aminoácidos neutros) o Glp-His-Pro-Z (siendo Z Gly, NH₂, OH), generando productos que no tienen afinidad con los TRHRs (Wilk y Wilk 1989, Elmore *et al.* 1990). De esta forma, se producen dipéptidos como His-Pro-NH₂, que posteriormente pueden ser degradados a His-Pro por la dipeptidil aminopeptidasa IV (DAPIV), una ectoenzima presente en muchos órganos, incluyendo el cerebro, o pueden ciclar espontáneamente a DKP (Charli *et al.* 1998).

En cuanto a su estructura, la PPII está compuesta por un dominio N-terminal intracelular que tiene un sitio potencial de unión a PKC, un dominio transmembranal y un gran dominio extracelular C-terminal (Chávez-Gutiérrez *et al.* 2005) que contiene el sitio activo característico de las peptidasas de zinc de la familia M1 de glucinas y 12 sitios putativos de N-glicosilación (Schauder *et al.* 1994, y Shomburg *et al.* 1999).

Así, la vía de señalización del TRH depende de la biosíntesis del tripéptido, de su liberación, de la interacción del TRH con sus receptores y finalmente de su inactivación por una peptidasa específica. Conocer la relación espacial entre el TRH, sus receptores y la PPII nos permitirá entender mejor la interacción entre ellos en diferentes áreas como el septum, donde no se ha comprobado. Si la interacción entre estos elementos es satisfactoria, se podrán realizar evaluaciones del papel del TRH bajo diferentes condiciones de interés, permitiendo dilucidar su papel y regulación en esta zona.

2. ANTECEDENTES

2.1. El TRH y su efecto analéptico

El TRH ha sido implicado en múltiples funciones asociadas a diversos componentes anatómicos del cerebro. Entre ellos se encuentran varias regiones del sistema límbico como el septum, que modula varios aspectos de la memoria, el aprendizaje, el estado de ánimo y la del ritmo θ (Dutar *et al.* 1995, Gary *et al.* 2003, Horita 1998).

Inicialmente, se observó que la administración intraperitoneal, intraventricular u oral de TRH y varios de sus análogos sintéticos es capaz de revertir varios estados depresivos, como la hibernación (Stanton *et al.* 1981, Tamura *et al.* 2005), la sedación e hipotermia producida por pentobarbital (Bresse *et al.* 1975) y etanol (Cott *et al.* 1976, Mc Cown *et al.* 1986, Horita 1998), opioides, fenotiazinas, y benzodiazepinas (Gary *et al.* 2003). Dicho efecto se conoce como efecto analéptico. La reducción del sueño inducido por etanol no depende del antagonismo de la hipotermia inducida por la droga, ya que al administrar TRH en ardilla (Stanton *et al.* 1981), en ratón, en hamster y en gerbo sedados con etanol, se revierte la sedación e hipotermia, pero al hacerlo en rata y en cuyo solo se reduce la sedación (Cott *et al.* 1976).

Posteriormente, estudios de microinyección del TRH en diferentes regiones del cerebro indicaron que el septum y varias áreas relacionadas con él, como es el caso del hipocampo, son los substratos responsables del efecto analéptico, siendo el septum medio (MS) y la banda diagonal de Broca (DBB) los más sensibles (McCown *et al.* 1986, Kalivas y Horita 1980, Morzorati y Kuberk 1993), respondiendo incluso a concentraciones de tan solo 5.0 ng (Kalivas y Horita 1979). Adicionalmente, se observó que el etanol suprime los disparos del MS, pero no del septum lateral (LS) (Givens y Breese 1990b). En forma interesante, se observó que, entre sus múltiples efectos, el etanol induce la síntesis y liberación de TRH (Kučerová y Štrbák 2001, Nikodémová *et al.* 1998) de los sinaptosomas de neuronas septales (Kalivas y Horita 1980), pero no de TRH del área hipofisiotrópica (Nikodemova *et al.* 1998).

Las neuronas colinérgicas que componen al sistema septo-hipocampal, han sido señaladas por diversos grupos como las responsables de generar el efecto analéptico mediado por el TRH en roedores (Kalivas y Horita 1980, Breese *et al.* 1975). Lesiones

en la fimbria/fórnix o en el septum medio impiden la reversión de la narcolepsis (Kalivas *et al.* 1981) y provocan que la acetilcolín transferasa (ChAT) y acetilcolinesterasa (AChE) se acumule en el septum, mientras que en el hipocampo se observa un decremento de dichas enzimas cercano al 90% (Palacios 1991). En contraste, las lesiones en el septum lateral o dorsal (Mellegren y Srebro 1973, Oderfeld-Nowak *et al.* 1974), o lesiones en las fibras inter e intrahipocampales (Storm-Mathisen 1972) no tienen efecto en la concentración de ChAT y AChE en el hipocampo, siendo consistente con la hipótesis de que el componente colinérgico del MSDBB es importante para generar el efecto analéptico del TRH. Debido a que al inyectar ácido cainico directamente al MS la unión del TRH a su receptor disminuye en forma importante y que esto produce una disminución en la incorporación de colina en el hipocampo aproximadamente en la misma magnitud, se ha propuesto que los receptores del TRH deben estar presentes en las neuronas colinérgicas del complejo MSDBB. Esto se ve apoyado por el hecho de que el uso de drogas anticolinérgicas suprime el efecto analéptico del TRH (Cott *et al.* 1976, Horita *et al.* 1991), mientras que al utilizar agonistas colinérgicos se induce (Cott *et al.* 1976). Adicionalmente, se ha observado que los receptores muscarínicos (mAChRs), pero no los nicotínicos, son los responsables de mediar la transmisión colinérgica, dado que al utilizar inhibidores como la escopolamina no hay reversión del estado narcoléptico (Breese *et al.* 1975). Sin embargo, cabe mencionar que existen evidencias que contradicen lo anterior (Santori *et al.* 1981).

Por otro lado, la estimulación eléctrica *in vivo* del septum medio induce la liberación de ACh en el hipocampo (Dudar 1975, Rommelspacher *et al.* 1974), mientras que al estimular el septum lateral o el hipocampo contralateral, no hay efecto (Dudar 1975), sugiriendo que el TRH produce la despolarización de las neuronas colinérgicas del septum medio. Lo anterior se ve apoyado por la observación de que la administración de acetil colina en células piramidales hipocampales produce una despolarización del potencial de membrana y un incremento en la resistencia membranal mediado por los mAChRs (Cobb y Davies 2005). Así, la estimulación eléctrica del septum medio en animales drogados con etanol induce la recuperación inmediata de la conciencia en una forma similar a la inducida por la inyección de TRH, y esto es bloqueado por atropina (Mc Cown *et al.*, 1986). Por otro lado, se sabe que el pentobarbital reduce la tasa de recambio de ACh e incrementa el contenido de colina y ACh (Santori y Schmidt 1980), mientras que el TRH incrementa esta tasa y antagoniza la baja en la toma de colina y los

niveles de ACh en rata (Brunello y Cheney 1981). En forma adicional la administración de atropina evita el incremento en la tasa de recambio (Breese *et al.* 1975). Las evidencias anteriores sugieren que el efecto analéptico del TRH se debe a que este estimula la liberación de acetilcolina por parte de las neuronas del MS, la cual es liberada en el hipocampo por medio del sistema fimbria-fórnix, y que actúa por medio de los mAChRs para poder ejercer el efecto analéptico del TRH. Cabe mencionar que las terminales colinérgicas provenientes del septum medio terminan preferentemente en las células piramidales y granulares dentadas del hipocampo, así como en capas celulares adyacentes a ellas, con la mayor densidad en el stratum oriens (Frotscher y Leranath 1985, Houser *et al.* 1983, Matthews *et al.* 1987).

Por último hay que mencionar que el efecto analéptico producido por el TRH tiene varias características importantes. El efecto va acompañado de un característico temblor de las extremidades anteriores, de un incremento en la respiración y en el tono muscular, de piloerección y lagrimeo (Cott *et al.* 1976). Es independiente del eje pituitario tiroideo, ya que al realizar una hipofisectomía no se reduce el antagonismo del TRH y al inyectar intraperitonealmente T3 o T4 no se revierte el efecto depresivo del etanol (Cott *et al.* 1976). EL TRH no aumenta el metabolismo de la droga (Cott *et al.* 1976). El efecto es dosis dependiente cuando se administra al TRH en el septum medio (Kalivas y Horita 1980), directamente en el hipocampo (Stanton *et al.* 1981) o en forma intraventricular, pero no en forma intraperitoneal u oral (Cott *et al.* 1976). Es estado-dependiente de la actividad del SNC, ya que provoca el despertar en animales drogados o en hibernación, mientras que en animales eutérmicos despiertos puede inducir el sueño e hipotermia en una forma dosis dependiente (Stanton *et al.* 1981), apoyando el papel del TRH como neuromodulador.

2.1. Organización del septum

2.2.1. Regiones

El septum es una región que forma parte del sistema límbico con interconexiones extensas y recíprocas con áreas telencefálicas y diencefálicas y en menor extensión con el mesencéfalo, tallo bajo del cerebro y regiones de la espina dorsal. El septum está relacionado con el control de una variedad de procesos fisiológicos y de comportamiento relacionadas con funciones cognoscitivas como el aprendizaje, la

memoria, las emociones, el miedo, la agresión y el estrés, así como la regulación autonómica como la ingesta de agua y comida, la fiebre, la hibernación, la osmoregulación y las respuestas humorales inmunes.

En rata, el septum asemeja una estructura con forma de barril flanqueada por los ventrículos laterales y está delimitado en la parte dorsal por el cuerpo calloso. El septum está compuesto por cuatro regiones principales (Fig. 1). La primera es el LS, que está subdividido en dorsal (LSD), intermedio (LSI) y ventral (LSV). Adicionalmente, el LSI, por ser la subdivisión más grande, se llega a segmentar en lateral y medial. La segunda región es el MS, que es una región más pequeña que el septum lateral y que se localiza centralmente en relación a ella. Esta región puede ser dividida en el MS, localizado dorsalmente y el núcleo de la banda diagonal de Broca, también referido como el complejo del septum medio-banda diagonal de Broca (MSDBB), o complejo del septum medio, localizado centralmente. La tercera región está constituida por los núcleos ventrales y laterales adyacentes a la comisura anterior, como es el caso del núcleo de la estría terminal. La cuarta región está compuesta por los núcleos septales posteriores, que incluyen al núcleo septo-fimbrial (Sfi) y triangular (Swanson y Cowan 1977, Swanson y Cowan 1979). Estas divisiones están basadas en el tamaño, densidad y morfología de sus neuronas; sin embargo, no hay delimitaciones bien definidas entre ellas.

2.2.2. Fenotipos neuronales

Dentro de estas divisiones establecidas, se observan varias poblaciones neuronales, de las cuales las neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas presentan una densidad mayor. Los somas de las neuronas GABAérgicas y colinérgicas son de tamaño similar; sin embargo, las neuronas más largas son generalmente colinérgicas (Kimura *et al.* 1980, Onteniente *et al.* 1987). Morfológicamente los dos tipos de neuronas son predominantemente multipolares (Colom 2006).

La distribución de estas poblaciones neuronales está organizada en el eje medial-lateral (Fig. 1). La gran mayoría de las neuronas colinérgicas septales están distribuidas en el MSDBB con un estimado de 9600 neuronas en rata (Colom 2006). Estas neuronas tienen una clara relación de topografía, tiempo de desarrollo y patrón de conectividad. Aquellas localizadas caudalmente y generadas más tempranamente proyectan hacia la

neocorteza, mientras que las neuronas colinérgicas rostrales, generadas más tarde, proyectan hacia el hipocampo (Paxinos 1995).

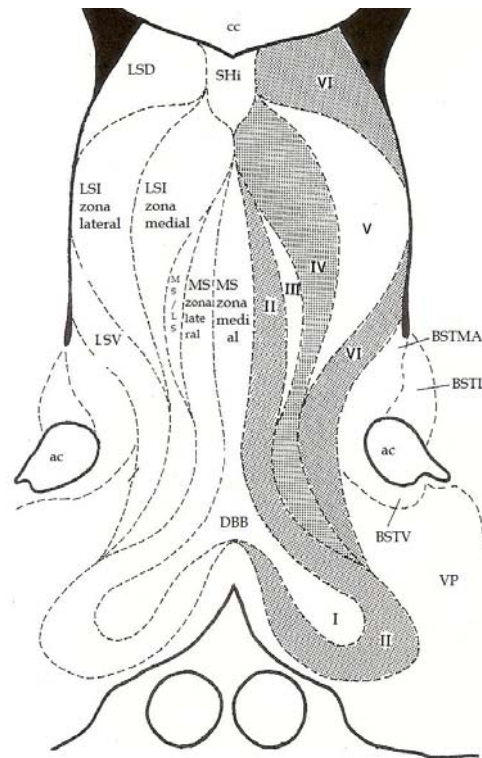


Figura 1. Dibujo esquemático mostrando una sección frontal al nivel central del septum, donde es claramente visible el patrón laminado que lo conforma. **ac**; comisura anterior; **BSTL**, núcleo de la estría terminalis, división lateral; **BSTMA**, núcleo de la estría terminalis, división medial; **BSTV**, núcleo de la estría terminalis, división ventral; **cc**, corpus callosum; **DBB**, banda diagonal de Broca; **LSD**, septum lateral dorsal; **LSI**, septum lateral intermedio; **LSV**, septum lateral ventral; **MS**, septum medial; **SHi**, núcleo septo-hipocámpico; **VP**, pallidum ventral. Dentro de estas regiones predomina algún tipo de neurotransmisor de acuerdo a los números romanos. **I**, neuronas GABAérgicas con parvalbúmina; **II**, neuronas colinérgicas y glutamatérgicas; **III**, neuronas con sustancia P, neurotensina, calbindina, calretinina y neuronas GABAérgicas sin parvalbúmina; **IV**, neuronas positivas a encefalina; **V**; neuronas positivas a GABA y neurotensina; **VI**, neuronas positivas a GABA principalmente y pequeñas poblaciones de neuronas positivas a calretinina, sustancia P, somatostatina, neurotensina y angiotensina II (modificada de Paxinos 1995).

Las neuronas GABAérgicas se distribuyen tanto en el MSDBB como en el LS, siendo prevalentes en el último (Colom 2006). Este tipo de neuronas puede ser subdividido en dos subpoblaciones basadas en la presencia o ausencia de parvalbúmina, una proteína de unión a calcio (Paxinos 1995). Las neuronas GABAérgicas con parvalbúmina son principalmente neuronas de proyección, mientras que las deficientes parecen neuronas del circuito local. En la proyección vertical de la banda diagonal del septum medio (MSvDBB), las neuronas positivas en parvalbúmina se encuentran esparcidas en la zona de la línea media, mientras que las negativas son más numerosas en las partes laterales. En la parte horizontal de la banda diagonal (hDBB), las neuronas negativas en

parvalbúmina son más numerosas, mientras que las que si la contienen son muy escasas (Paxinos 1995).

Los cuerpos celulares GABAérgicos del LS se concentran en la parte dorsal y ventral, mientras que la intermedia es generalmente carente de neuronas GABAérgicas. Todas las neuronas encontradas en los subnúcleos del LS expresan ARNm del receptor a andrógenos. Por otro lado, el ARNm de receptor a estrógenos sólo se encuentra en LSV (Paxinos 1995).

La población glutamatérgica se localiza en el MSDBB con un estimado de 16,000 neuronas (Colom *et al.* 2005, Manseau *et al.* 2005). Esta distribución neuronal no es azarosa, dado que hay regiones septales en donde predominan la acetil colintransferasa, la parvalbúmina, la calbindina y la calretinina (Kiss *et al.* 90, Kiss *et al.* 97), indicando que los neurotransmisores son sintetizados en esos sitios específicos.

En el borde entre el MS y el LS se forma una delgada banda dorso-ventral con neuronas que sintetizan sustancia P y que dan lugar a proyecciones discretas que se restringen a las porciones medio-septotemporales del área CA2/3 del hipocampo. Adicionalmente, también se puede observar una delgada banda de neuronas que sintetizan neurotensina, y otras poblaciones con elementos como calretinina y calbindina (Paxinos 1995).

2.2.3. Eferentes

Las neuronas colinérgicas localizadas en el septum medio y en la banda diagonal de Broca proveen la mayor población colinérgica que inerva a la formación hipocampal. Esta ruta que conecta al septum con el hipocampo se denomina ruta septo-hipocampal (Shi) y las proyecciones que recibe el hipocampo son principalmente ipsilaterales; sin embargo también existe una ruta Shi cruzada (Peterson 1989).

Anatómicamente la ruta Shi es considerada una estructura contigua (septum-fimbria/fórnix-hipocampo). Sin embargo, la ruta no es puramente colinérgica, ya que también incluye a las poblaciones GABAérgicas, que cubren del 10% al 30% de la proyección (Colom *et al.* 2005, Köhler *et al.* 1984) y neuronas glutamatérgicas (Köhler *et al.* 1984, Colom *et al.* 2005, Manseau *et al.* 2005) que cubren el 23% de las proyecciones (Colom *et al.* 2005).

Las neuronas colinérgicas septohipocampales hacen sinapsis con las neuronas hipocampales principales, así como con las interneuronas, mientras que las neuronas GABAérgicas sólo hacen sinapsis con las interneuronas hipocampales (Freund y Antal 1988). Se desconocen los blancos glutamatérgicos de la ruta septo-hipocampal.

Topográficamente, la ruta Shi está localizada a lo largo de los ejes medio lateral y rostrocaudal. Mientras más lateralmente se encuentren las neuronas septales, más ventralmente proyectarán al hipocampo y mientras más rostralmente proyecten al hipocampo, más rostro-medialmente estarán localizadas en el septum (Amaral y Kurz 1985, Meibach y Siegel 1977, Milner *et al.* 1983).

Además de inervar al hipocampo, el MSDBB contiene neuronas que inervan la corteza cingulata, el bulbo olfatorio principal, el hipotálamo, el complejo mamilar, el rafe, el tálamo y otras estructuras corticales (Fig. 2) (Gayakema *et al.* 1990, Lamour *et al.* 1982, Swanson y Cowan 1979).

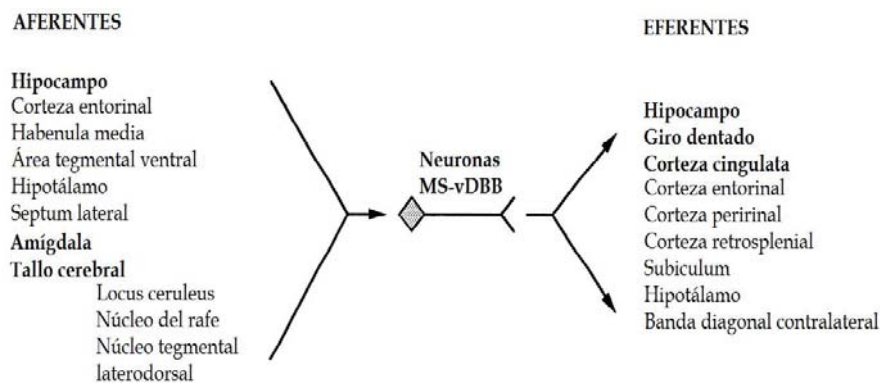


Figura 2. Estructuras que proyectan (aferentes) a la parte vertical del MSDBB (MS-vDBB) o reciben las proyecciones (eferentes) de esta área. Las principales aparecen en negritas (Modificada de Dutar *et al.* 1995).

El LS por su parte tiene neuronas que proyectan al complejo MSDBB (Risold y Swanson 1997b) y proyecta de regreso al hipocampo por medio de la ruta fimbria-fórnix (Colom 2006). La parte ventral del LS también envía proyecciones hacia el hipotálamo, el complejo mamilar (incluyendo la región supramamilar) y el área tegmental ventral.

En forma clásica se ha aceptado que la principal ruta de conexiones septohipocampales ocurre del LS al MS y al hipocampo. Sin embargo, se ha visto que el circuito

septohipocampal es más complejo, pudiendo existir tres asas que conecten diferentes elementos de esta estructura (Leranth *et al.* 1992, Risold y Swanson 1997b). La primera entre el septum lateral y el hipocampo (LS→ Hipocampo→LS), la segunda entre el MSDBB y el hipocampo; y la tercera que incluye ambos núcleos con el hipocampo (Colom 2006).

2.2.4. Aferentes del septum

Como anteriormente se mencionó, el septum y el hipocampo están fuertemente interconectados por medio de la fimbria y el fórnix. De igual forma que el septum envía proyecciones al hipocampo, recibe aferentes del mismo. Las aferentes de dicha formación hipocampal son consideradas la mayor fuente de inervación del septum lateral y en forma adicional las neuronas de este último proyectan al complejo MSDBB (Risold y Swanson 1997b). Al lesionar la fimbria, se ha visto que la formación hipocampal da lugar al 55% de las terminales axónicas del LS.

Mediante marcaje retrógrado con la peroxidasa de rábano y tinción inmunohistoquímica, Ishikawa y colaboradores observaron que el septum lateral recibe proyecciones de varias neuronas TRHérgicas que circundan al fórnix en el área preóptica lateral e hipotálamo lateral, así como de neuronas localizadas en el BNST, ventral pallidum ventral y órgano perifornical. En contraste, observaron que el LS no recibe proyecciones del PVN (Ishikawa *et al.* 1986). Sin embargo, también hay reportes que contradicen este último punto, indicando que el centro del PVN proyecta exclusivamente al LSV; siendo las aferentes fibras serotoninérgicas y peptidérgicas, incluyendo al TRH (Paxinos 1995).

En cuanto al MSDBB, recibe proyecciones ascendentes de varios núcleos hipotalámicos y del tallo cerebral (Vertes 1992 y Vertes *et al.* 1995). Otras áreas que inervan al MSDBB son el área tegmental ventral, el septum lateral, el área septal posterior, la amígdala y el hipocampo (Paxinos 1995, Zaborsky y Cullinam 1989).

En términos de neurotransmisores, el septum medio recibe 1) aferentes colinérgicas del tegmentum pontomesencefálico (Jones y Cuello 1989, Woolf y Butcher 1986), 2) aferentes del núcleo aminérgico del tallo cerebral como el locus coeruleus y el núcleo del rafe (Kim *et al.* 1987, Köhler *et al.* 1982), 3) aferentes dopaminérgicas del área

ventral tegmental (Lamour y Epelbaum 1988) y 4) proyecciones GABAérgicas del hipocampo y del núcleo septal lateral (Onteniente *et al.* 1986, Toth *et al.* 1993).

Finalmente, el circuito Shi contiene 1) proyecciones de neuronas piramidales glutamatérgicas que terminan en células del septum lateral y en el MSDBB (Leranth y Frothstcher 1989, Swanson y Cowan 1979, Toth *et al.* 1993) y 2) proyecciones de neuronas GABAérgicas no piramidales (la mayoría de ellas siendo inmunoreactivas a calbindina) que terminan principalmente en neuronas GABAérgicas y colinérgicas (Toth y Freund 1992, Toth *et al.* 1993). Adicionalmente, también hay un pequeño grupo de proyecciones del septum lateral hacia el septum medio (Leranth y Frothscher 1989, Onteniente *et al.* 1986, Staiger y Nurnberger 1991).

2.2.5. Distribución de TRH, TRHRs y PPII en el septum

Conocer la distribución de los elementos de la ruta de señalización del TRH es fundamental, ya que permite indagar sobre los posibles roles de dichos elementos. Adicionalmente, la información filogenética puede proporcionar datos valiosos, como es el caso de los receptores del TRH, que están distribuidos en regiones cerebrales filogenéticamente antiguas (Manaker *et al.* 1985), sugiriendo que el TRH y sus receptores regulan procesos biológicos básicos en el sistema nervioso central.

Utilizando técnicas de inmunolocalización, se ha detectado la prohormona de TRH en la banda diagonal de Broca y en el septum medio (Segerson *et al.* 1987). Adicionalmente el TRH presenta concentraciones relativamente elevadas, siendo las zonas adyacentes a los ventrículos laterales las que contienen la mayor concentración; en especial, el núcleo dorsal con 1.86 ng/mg de proteína y el lateral (LS) con 2.97 ng/mg de proteína (Brownstein *et al.* 1974). Estudios de autoradiografía demuestran que hay niveles moderadamente altos (100 a 200 fmol/mg) a muy elevados (200-400 fmol/mg) de receptores de TRH en el septum (Manaker *et al.* 1985). En cuanto a los mensajeros, estudios de hibridación *in situ* demuestran que el ARNm de la PPII presenta una distribución similar a la del ARNm de los receptores de TRH en varias regiones del cerebro (tabla 1, Heuer *et al.* 2000), apoyando una posible interacción funcional entre ellos.

2.2.5.1. Complejo del septum medio-banda diagonal de Broca

Se ha reportado que el ARNm de la pro-hormona de TRH está presente en la banda diagonal de Broca (Segerson *et al.* 1987). Sin embargo, y en forma contradictoria, otros autores no lo detectaron (Heuer *et al.* 2000); esto puede deberse a una diferencia de sensibilidad de cada prueba. Por otro lado, estudios por radioinmunoensayo revelan la presencia de TRH en esta área (Brownstein *et al.* 1974). En cuanto al ARNm de la PPII, se observa una distribución escasa (Heuer *et al.* 1998). En el MSDBB se sintetizan ambos tipos de receptores de TRH, siendo relativamente alto el nivel de ARNm del TRHR1 y bajo el del TRHR2 (tabla 1) (Heuer *et al.* 2000, O'Dowd *et al.* 2000). Consistentemente, estudios de autoradiografía demostraron los mismos resultados a nivel proteico (Manaker *et al.* 1985). Los receptores tienen una distribución bien definida, teniendo el ARNm del TRHR2 concentrado en la parte central del septum medio, sitio que envía proyecciones principalmente GABAérgicas hacia el hipocampo mientras que el ARNm del TRHR1, es más prevaleciente en la región lateral del MSDBB y núcleo medial (Heuer, *et al.* 2000, Zabavnik *et al.* 1993), donde las proyecciones hacia el hipocampo son principalmente colinérgicas. Consistentemente, estudios de autoradiografía demostraron niveles elevados de receptor en esta región (Manaker *et al.* 1985).

2.2.5.2. Septum lateral

En este núcleo, el ARNm del TRHR2 es indetectable (tabla 1), mientras que hay bajos niveles de ARNm del TRHR1 en la región medioventral. Este núcleo septal recibe fibras positivas a TRH de diversos sitios (Ishikawa *et al.* 1986, Hökfelt *et al.* 1975) y es el núcleo septal con mayor concentración de TRH registrado por RIA (Brownstein *et al.* 1974). Finalmente, este núcleo exhibe altos niveles de ARNm de PPII (Calza *et al.* 1992, Heuer *et al.* 2000, Zabavnik *et al.* 1993).

	TRHR2	TRHR1	PPII	TRH
Septum lateral	-	-	++++	-
Septum medio	+++	++	+	-
Banda diagonal de Broca, parte horizontal	++	++++	+	-
Banda diagonal de Broca, parte vertical	+	+++	++	-

Tabla 1. Distribución general de los ARNm de PPII, TRH, TRHR1 y TRHR2 en el septum según Heuer *et al.* (2000). +++++, máxima densidad; +++++, muy denso; +++, denso; ++, moderado; +, bajo; -, no detectable.

3. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes sugieren, pero no demuestran, la posible colocalización celular entre la PPII y algún receptor de TRH en el septum de rata. Esta posibilidad parece ser un poco más clara para el par PPII/TRHR1 debido a la alta concentración de ARNm de TRHR1 reportada por algunos grupos (Calza *et al.* 1992, Heuer *et al.* 2000, Zabavnik *et al.* 1993). Demostrar claramente esta colocalización permitirá obtener más información sobre el papel de la PPII en la comunicación de tipo TRHérgico en esta región, ya que por el momento no existe estudio alguno que demuestre que los ARNm se expresan en la misma célula, ni que aclare si estas dos proteínas coinciden. La analepsis es uno de varios efectos modulados por el TRH en el septum de la rata, pero a diferencia de los demás, se sabe *grosso modo* que el MSDBB es el substrato específico encargado de producirlo. Por lo tanto, identificar las zonas con mayor concentración de ARNm de la PPII y del TRHR1 permitirá conocer las poblaciones neuronales blanco del TRH, generando la posibilidad de restringir el área de microinyección del tripéptido, así como de antagonistas de la PPII para definir si la enzima modula el nivel extracelular del TRH en esta condición.

4. OBJETIVOS

- 1) Describir la distribución regional del ARNm de la PPII y del TRHR1 en el septum de rata.
- 2) Determinar si el ARNm de la PPII y el ARNm del TRHR1 colocalizan en las neuronas del septum y cuál es la distribución de las neuronas que las co-expresan.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Dado que no hay evidencias de que los anticuerpos específicos contra la PPII sean útiles en inmunohistoquímica, se obtendrá información a nivel celular de la distribución de su ARNm por hibridación *in situ* simple y se intentará colocalizarlo con el ARNm del TRHR1 por medio de hibridaciones *in situ* dobles. Las sondas de ARNc se obtuvieron a partir de la transcripción *in vitro* con UTP (³⁵S) o UTP-digoxigenina. De esta forma se intentará obtener datos que sugieran la colocalización entre los productos expresados en el septum del roedor.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Tratamiento del material y agua

Todo el material de vidrio y metal utilizado se horneó a 180 °C por lo menos durante 3 horas. Las cajas de vidrio, vasos de coplin y las barras magnéticas se autoclavearon a 120 libras de presión por 20 minutos. Debido a que no utilizamos tratamientos con dietil pirocarbonato (DEPC) para evitar contaminación con ARNasas, se empleó agua grado milli Q-UF (resistividad de 18 m-ohms) pasada através de filtros de 0.22 µm. El agua se recolectó directamente en botellas de vidrio previamente horneadas y fue autoclaveada. En el proceso de la hibridación se utilizaron guantes sin talco y se trató de mantener las laminillas libres de polvo para evitar el ruido de fondo.

6.2. Plásmidos utilizados

Se empleó el plásmido pSPT19-PPII para generar el ARNc de la PPII. Este plásmido fue generado por la subclonación de un fragmento de 676 pb que corresponde a los nucleótidos 129 a 773 del ADNc del ARNm de dicha enzima en el vector de transcripción *in vitro*. La clonación se realizó entre los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 y estas enzimas se utilizaron en forma respectiva para producir el ARNc antisentido y sentido (Fig. 3).

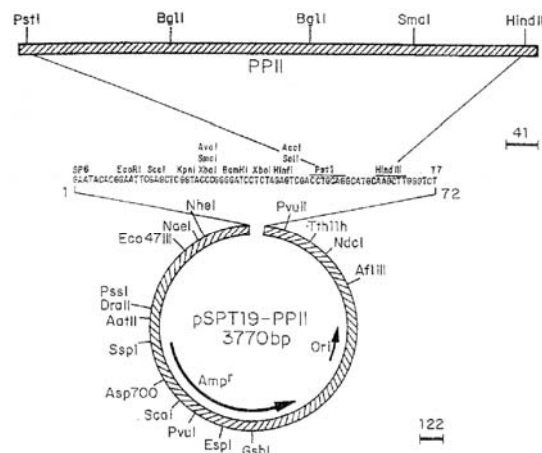


Figura 3. Plásmido pSPT19-PPII. Se muestran los sitios de restricción que contiene y los sitios en los que está insertada la secuencia de bases de la PPII.

La sonda de ARNc del TRHR1 se obtuvo del plásmido pcDNA3-TRHR1, el cual contiene el ADNc completo del TRHR1 de rata (Chang-Cheng *et al.* 2002). La sonda

antisentido del TRH-R1 se generó linearizando el plásmido con la enzima de restricción *HindIII* y empleando la ARN polimerasa SP6, mientras que la sonda sentido se generó linearizando al plásmido con *XbaI* y usando la ARN polimerasa T7.

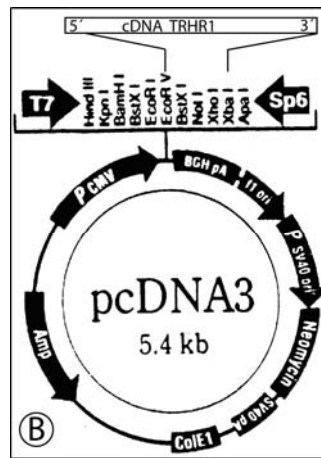


Figura 4. Plásmido pcDNA3-TRHR1. Se indican los sitios de restricción que contiene, así como los sitios entre los cuales está insertada la secuencia del TRHR1.

6.3. Transcripción *in vitro* con digoxigenina-UTP

Se precalentó a 65 °C por 5 minutos 1 ug de ADN de plásmido linearizado con EcoR1 (Biolabs) o *HindIII* (Biolabs) para las sondas de PPII; en el caso del TRHR1 digerido con *HindIII* o *XbaI* (Biolabs). Inmediatamente después, se colocan los tubos 5 min en hielo y se centrifugaron rápidamente para recolectar todo el volumen en el fondo del tubo. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos para un volumen final de 20 µl:

- 2ul de buffer de transcripción 10X
- 2 ul de DTT 100 mM
- 4 ul de una mezcla de nucleótidos que contiene CTP 10 mM, GTP 10mM, ATP 10mM y UTP 2 mM.
- 1 ul Dig-UTP 10 mM
- Agua libre de ARNasas para completar el volumen final

Se mezcló suavemente el volumen de reacción y se recuperó por centrifugación rápida. Inmediatamente después se adicionó sobre el volumen de reacción 1 ul de inhibidor de ARNasas (40 U/µl) y 2 ul de ARN polimerasa (SP6, 1000U/ml; T7, 50000 U/ml). La reacción se incubó a 37 °C por 1 h y se adicionaron nuevamente 2 ul de ARN

polimerasa, incubando la reacción durante 1 h mas a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se adicionaron 2 ul de ADNasa Q y 1 ul de inhibidor de ARNasa y se incubó a 37 °C por 45 minutos. La reacción se detuvo adicionando 80 ul de DTT 20 mM y el ARNc generado se precipitó agregando a la mezcla de reacción 10 ul de NaCl 4 M y 330 ul de etanol absoluto frío. Los tubos se colocan a -70 °C por lo menos 2 hrs y se recupera el ARN centrifugando a 15121 g durante 30 minutos a 4 °C. La pastilla se lavó con etanol 75% para remover las sales, se secó y resuspendió en 50 ul de SDS al 0.02% preparado con agua libre de ARNasas.

6.4. Determinación de la eficiencia de transcripción con UTP-digoxigenina

Para determinar la eficiencia de la transcripción con digoxigenina y el tamaño aprox. del transcrito, se sometió el ARN a electroforesis, usando un gel desnaturalizante (agarosa 1%, fosfato de sodio 10 mM pH 7.0, formaldehído 2.2 M). Este gel se hizo de un grosor aproximado de 0.5 mm para transferir el ARNm por capilaridad con mayor eficiencia y las muestras se desnaturalizaron antes de someterlas a la electroforesis:

- 10 ul de formamida (formamida, xilencianol 0.001%)
- 3.5 ul de formaldehído 37%
- 0.5 ul de bromuro de etidio 10 mg/ml
- 0.4 ul de fosfato de sodio 0.5 M pH 7.0
- agua libre de ARNasas para llegar a un volumen final de 20 ul
- Calentar las muestras a 65 °C por 15 minutos

El gel se corrió a 60 volts con un buffer de fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y se utiliza un marcador de peso molecular y una muestra control de ARN marcado con digoxigenina, lo que permitió determinar la cantidad de UTP-digoxigenina incorporado en el ARNc generado y calcular la concentración del ARNc sintetizado mediante un análisis densitométrico con un Fluor-S-multimager (Biorad). Posteriormente, se el ARN se transfirió durante 36 horas por capilaridad a una membrana de Nylon (Nytran S&S) utilizando como buffer de transferencia SSC 20X. Al terminar la transferencia se marca la membrana, se retiró y colocó sobre papel Whatman 3 MM y se fijó por entrecruzamiento con luz UV con un Stratlinker (Stratagene). La membrana se humedeció con buffer B (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) y se incubó en solución de bloqueo 2% en buffer de fosfatos 50 mM pH 7 (Northern

blocking solution, Roche). Para obtener el color se diluyó el anticuerpo anti-DIG acoplado a fosfatasa alcalina 1:2500 en solución de bloqueo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. La membrana se lavó 5 veces con buffer B a temperatura ambiente y se incubó por 2 minutos en buffer B. Transcurrido el tiempo, se desechó el buffer B y en la oscuridad se añadió el sustrato de la fosfatasa alcalina, el cual contiene 45 µl de NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) y 35 µl de BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt) por cada 10 ml de solución B. La solución se dejó actuar hasta que el color se generó, monitoreado el progreso ocasionalmente. Finalmente la membrana se lavó con solución B para detener el proceso de revelado del color y se realizó el análisis densitométrico. En general se obtuvieron de 6 a 9 µg de ARN y los transcritos se generaron completos.

6.5. Transcripción *in vitro* con ³⁵S-UTP

Se utilizaron 120 ó 150 pmol de UTP-³⁵S para un volumen de reacción de 10 µl. Utilizamos UTP-³⁵S con una actividad específica de 1250 Ci/mmol y en general, el nucleótido viene a una concentración de 12.5 uCi/µl, por lo que fue necesario concentrarlo secándolo por evaporación.

Se calentaron a 65 °C por 5 minutos 0.5 µg de ADN del plásmido de interés previamente linearizado. Inmediatamente después se colocó en hielo por 5 minutos y se colecta todo el volumen por centrifugación rápida. Posteriormente al tubo que contenía el nucleótido radioactivo se le adicionaron los siguientes reactivos para un volumen final de 10 µl.

- 1 µl de DTT 100 mM
- 2 µl de una mezcla de nucleótidos (CTP, GTP, ATP) a una concentración de 10 mM
- 0.5 µl UTP frío para ajustar a 150 pmol.
- 1 µl de buffer de transcripción 10X
- 0.5 µl de inhibidor de ARNasas (Roche)
- 1 µl de la ARN polimerasa
- Agua libre de ARNasas para obtener un volumen final de 10 µl.

Esta mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 1 hora. Posteriormente se adicionó nuevamente 1 µl de ARN polimerasa y se dejó incubar por otra hora. Al transcurrir la hora, se adicionó 1 µl de ADNasa I, 0.5 µl de inhibidor de ARNasas y 1 µl de ARNt (10

mg/ml), se incubó a 37 °C por 45 minutos. Se agregaron 40 µl de Ribostop (0.6 M de NaOAc, 10 mM EDTA, 1% SDS), después se añadieron 50 µl de fenol saturado en agua y 50 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó la fase acuosa que contenía el transcrito centrifugando a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A la fase recuperada se le agregaron otros 50 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y nuevamente fue centrifugada a 10,000 rpm a 4 °C por 10 minutos para poder recuperar la fase acuosa. A esta fase, se le adicionaron 5 µl de NaCl 4 M, 165 µl de etanol absoluto frío y se colocaron los tubos a -70 °C al menos por 3 horas para poder precipitar el transcrito marcado. La recuperación del transcrito se realizó por centrifugación a 15,000 rpm a 4 °C por 30 minutos y se realizó un lavado con etanol 75% para eliminar el exceso de sales. Finalmente se resuspendió el transcrito en 50 µl de agua libre de ARNasas, SDS 0.02% y 10 mM de DTT.

6.6. Determinación del porcentaje de incorporación y actividad específica del transcrito marcado con UTP-³⁵S

Inmediatamente después de adicionar los 40 µl de Ribostop, se tomó una alícuota de 0.5 µl de la mezcla de reacción. Esta mezcla se diluyó en 25 µl de solución acarreadora (10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5 mg/ml ARNt). Se colocaron 5 µl de la mezcla por cuadruplicado en cuadros de 1 cm² de papel de intercambio iónico (DEAE 81 Whatman) y estos se dejaron secar. Dos de los papeles se guardaron (cpm totales) y el otro par se lavó (cpm incorporadas) como se indica:

-Se realizaron 5 lavados con Na₂HPO₄ 0.5 M por 5 minutos cada uno a un par de cuadros de cada sonda.

-Posteriormente se hizo 1 lavado con agua destilada por 1 minuto, otro lavado por 1 min con etanol 70% y se dejan secar. Los papeles se colocaron por separado en viales con 5 ml de líquido de centelleo (PPO 0.08%, POPOP 0.01% en tolueno).

-Se determinó la radioactividad en cada cuadro de papel DEAE 81 en un contador de centelleo β (Beckman) y se determinó la actividad específica en base al porcentaje de incorporación obtenido, es decir, la relación de cpms incorporados (corregidos por el factor de dilución) entre la cantidad de ARNC sintetizado (µg). La cantidad de ARN sintetizado se calculó en base al porcentaje de incorporación y tomando en cuenta que

757.57 pmol equivale a 1 ug de ARN. La actividad específica obtenida fue de 7 a 8 x 10⁸ cpm/μg.

6.7. Hidrólisis alcalina de los transcritos

El tamaño óptimo de las sondas en la hibridación *in situ* es de 50 a 300 nucleótidos. Este tamaño permite que las sondas tengan una buena tasa de ingreso al tejido y por lo tanto que se genere una mayor señal. Dado que la sonda de la PPII es de 676 pb y la sonda del receptor de TRH tipo 1 tiene un tamaño de 1.3 kb, se realizó una hidrólisis alcalina de la siguiente forma:

- A los 50 μl de sonda obtenida al resuspender la pastilla con el transcrito se le agregaron 30 μl de 0.2 M Na₂CO₃ y 20 μl de NaHCO₃ (para dar un pH de 10.2 a temperatura ambiente).
- La mezcla de hidrólisis se incubó a 60 °C. El tiempo se depende del tamaño de la sonda y se determina por la fórmula: $t = L_o - L_f / k L_o L_f$. Donde t es el tiempo en minutos, L_o y L_f son los tamaños iniciales y el finales del fragmento en kb. k es la constante de hidrólisis = 0.11 kb⁻¹ min⁻¹).
- La reacción se detuvo en hielo y añadiendo 5 μl de 10% v/v de ácido acético glacial, 2.5 μl de acetato de sodio 4.5 M, pH 6.0 y se mezcló por inversión.
- El transcrito se precipitó añadiendo 7.5 μl de acetato de sodio 4 M, pH 6.0, 300 μl de etanol absoluto, 1 μl de ARNt 10 mg/ml a -70 °C durante 6 horas.
- La sonda marcada con UTP-³⁵S se recuperó por centrifugación a 15000 rpm por 30 min a 4 °C y se resuspendió en 50 ul de SDS 0.02% y 10 mM de DTT. Las sondas marcadas con digoxigenina se resuspendieron en 50 ul de agua libre de ARNasas con 0.02% de SDS.

En el caso de las sondas con UTP-³⁵S y después de la precipitación, se determinó la cantidad de cpm recuperadas. En el conteo se espera un decremento de 10% a 20% de cpm; ya que si no existe pérdida alguna, es posible que la hidrólisis no se haya llevado a cabo y si dicho decremento fue muy elevado, es probable que la hidrólisis haya sido excesiva. Adicionalmente, se realizó una electroforesis en acrilamida 8%/urea 8M. Este gel fue expuesto a un film Biomax de Kodak con el fin de conocer el grado de hidrólisis y el tamaño de las sondas obtenidas.

6.8. Obtención de las rebanadas de cerebro

Ratas Wistar macho de 2 a 3 meses de edad fueron decapitadas utilizando una guillotina. Los cerebros fueron rápidamente removidos, congelados en hielo seco y almacenados a -70 ° C hasta ser cortados. Los cortes se hicieron en forma coronal, con un grosor de 20 µm de grosor, utilizando un criostato a una temperatura de -14 °C. Dichos cortes se montaron en portaobjetos previamente cubiertos con gelatina (piel de cisne tipo 11 de Sigma, 0.25 mg/ml) y posteriormente con poli-L-lisina (50 µg/ml, Sigma) y se guardaron a -70 °C hasta su utilización.

6.9. Preparación de los tejidos antes de la hibridación.

Los tejidos se sacaron del ultracongelador en hielo seco e inmediatamente después se deshidrataron con una secadora manual a una temperatura tibia hasta que estuvieron completamente secos. Posteriormente fueron sometidos a los siguientes tratamientos:

- Fijación en paraformaldehído 4% en PBS por 10 minutos.
- Lavado en PBS por 5 minutos.
- Acetilación en SSC 4X, trietanolamina 0.1 M y anhídrido acético 0.25%, pH 8.0 por 10 minutos.
- Lavado en SSC 2X por 5 minutos.
- Deshidratación del tejido en un orden ascendente de etanol (75%, 80%, 95%, 100%) por 2 minutos cada paso.
- Deslipidación en cloroformo por 5 min.
- Lavado en etanol al 100% por 2 minutos
- Re-hidratación en etanol al 95% por 2 minutos
- Secado al aire de los tejidos evitando al máximo el polvo.

6.10. Hibridación *in situ*

La mezcla de hibridación utilizada se preparó en fresco de la siguiente forma:

	% de volumen usado respecto al total
Sonda radioactiva (20×10^6 cpm/ml) o marcada con digoxigenina (84 μ g/45 μ l de mezcla de hibridación) previamente desnaturalizadas a 65 °C por 15 minutos	
Formamida + dextrán sulfato 20%	50%
Buffer de fosfatos (Na_2HPO_4 1 M, $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 1 M) + 10% de sarcosil	10%
Denharts 100X (Ficoll 2%, Polivinil pirrolidina 2%, BSA grado V 2%)	1%
ADN de esperma de salmón, 10 mg/ml, previamente desnaturalizado	2.5%
SSC 20X	10%
ARNt de levadura, 10 mg/ml	2.5%
DTT (preparado en fresco 0.08 g en 50 μ l acetato de sodio 0.01 M)	10%
Poli A 10 mg/ml	2.5%
Agua grado milli Q	Diferencia para alcanzar el volumen total deseado

Se colocaron 45 μ l de la mezcla de hibridación sobre los portaobjetos. Posteriormente se cubrieron con Parafilm, evitando la formación de burbujas. Los portaobjetos se incubaron a 52 °C de 6-10 hrs en una cámara húmeda con formamida al 50%.

6.11. Lavados de post-hibridación y preparación de los cortes para revelado de la señal radioactiva o de color

Estos lavados tienen como fin eliminar el pegado inespecífico y el exceso de sonda que no hibridó, tomando en cuenta que las sondas que colocamos son homólogas al ARNm de la PPII y del TRHR1.

Transcurridas las 6-10 hrs, se retiró suavemente el Parafilm de los portaobjetos con SSC 1X precalentado a 52 °C. Se hizo un lavado por 10 minutos con SSC 2X /50% formamida precalentada a 52 °C. Los portaobjetos fueron enjuagados dos veces en SSC 2X a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se incubaron por 30 min con SSC 2X, 1 mM EDTA pH 8.0, 40 ug/ml de ARNsa (Sigma) precalentado a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se hicieron dos lavados en SSC 2X a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente se hizo un lavado con SSC2X /formamida 50% a 52 °C por 15 minutos, seguido de dos lavados en SSC 0.1X, SDS 0.02% a 58°C por 15 minutos cada uno.

Transcurridos los lavados, los tejidos que fueron hibridados con UTP-³⁵S fueron deshidratados en un orden ascendente de etanol (70%, 80%, 95%) por 3 minutos. Se hizo un enjuague rápido con agua (meter y sacar los portaobjetos), seguido de un enjuague rápido en etanol 70%. Los tejidos se dejaron secar evitando al máximo el polvo. La señal autoradiográfica se reveló exponiendo los tejidos a una película autoradiográfico Biomax y/o emulsión fotográfica Kodak.

En el caso de los portaobjetos hibridados con UTP-Digoxigenina, se pusieron en solución de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente (5% Blocking reagent Roche, en buffer 50 mM de fosfato de sodio pH 7.0) y después con solución A, Tritón 100-X 0.2%, BSA 3% de 3-6 horas. Después se agregaron 85 µl de solución A con anticuerpo anti-Digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina 1:1000, Tritón 100-X 0.1%, BSA 1.5%. Los portaobjetos se cubrieron nuevamente con Parafilm y se dejaron incubando de 24-36 horas a 4 °C en una cámara húmeda. Transcurrido el tiempo, se llevó a cabo la reacción de revelado del color.

6.12. Revelado de sonda marcada con ^{35}S

Todos los procesos que se llevan a cabo para revelar la sonda se deben hacer en un cuarto oscuro con el fin de evitar cualquier incidencia lumínica que pueda provocar el velado de la emulsión fotográfica.

6.12.1. Macroautoradiografía. Exposición a la película autoradiográfica

Las láminas completamente secas se expusieron a una película Biomax de Kodak por una semana a temperatura ambiente (el tiempo depende del ARNm analizado). Transcurrido este tiempo, se reveló la película colocándola por 1 minuto en revelador GBX de Kodak, 1 minuto en agua de ósmosis inversa y 5 minutos en fijador GBX. Inmediatamente después se lavó con agua de la llave, seguido de una enjuagada con agua de ósmosis inversa y se dejó secar a temperatura ambiente. La película se observó en un transiluminador y las imágenes se obtuvieron con una cámara de video (COHU, solid state camera). Las imágenes fueron analizadas con el programa RAG (Biocom, France).

6.12.2. Microradiografía. Exposición a emulsión fotográfica

Se utilizó una emulsión fotográfica (NTB Kodak) diluida 1:1 con agua. Esta fue fundida a 45 °C por 20 minutos aproximadamente. Posteriormente se viertió en un vaso para emulsión y se introdujeron los portaobjetos uno por uno a la emulsión fotográfica. Los portaobjetos se dejaron secar por 3 horas con humedad (17 °C aproximadamente) y se guardaron a 4 °C por un mes (el tiempo depende del isótopo utilizado y de la concentración del ARN). Transcurridas las 4 semanas, se revelaron con los siguientes reactivos a una temperatura de 15 °C.

- Revelador D19 por 3 minutos (se prepara la cantidad aproximada a emplear en el revelado. El revelador se disolvió en agua destilada, se calienta a 52 °C en una proporción de 607 g de revelador/3.8 litros).
- Agua por 1 minuto
- Fijador GBX 5 minutos dos veces
- Agua destilada en agitación por 15 minutos

6.13. Revelado del color

Los portaobjetos se pusieron a temperatura ambiente por 30 minutos y se retira el Parafilm con solución A y se sometieron a los siguientes lavados:

-10 minutos en buffer A

-10 minutos en buffer B

-10 minutos en buffer B con levamisol (4.8 mg/20 ml)

-De 0.5 a 4 horas en reactivo de color (10 ml de buffer B, 50 µl NBT, 35 µl BCIP Roche). El tiempo de reacción dependió del momento en el cual se obtuvo la intensidad deseada de la sonda. El proceso fue monitoreado en el microscopio utilizando algunos cortes.

-3 lavados de 10 minutos cada uno con buffer B.

-Meter y sacar en buffer A.

-Meter y sacar en agua.

-Meter y sacar en etanol 50%

-Secar al aire.

6.14. Tinción y montaje de los tejidos

Los portaobjetos hibridados con sondas radioactivas se tiñeron con hematoxilina (Sigma) por 1 minuto y se hizo un lavado en agua de la llave por un minuto y medio para quitar el exceso de tinción. Posteriormente se las láminas deshidratadas en una serie de etanol a diferente concentración por 2 minutos cada una (50%, 75%, 80%, 95%, 100% dos veces). Al terminar, el tejido fue sometido a dos lavados en xilol por 3 minutos y el tejido se cubierto con un cubreobjetos y medio de montaje (Cytoseal™ 60, Richard-Allan Scientific).

Los portaobjetos hibridados con sondas marcadas con digoxigenina o aquellos sometidos a doble hibridación con ³⁵S y digoxigenina, no se deshidrataron y sólo se montaron con líquido de montaje (Cristal Mount™ aqueous mounting medium, Sigma) o glicerol al 50%.

6.15. Doble hibridación *in situ*

En estas hibridaciones el buffer de hibridación contenía tanto la sonda de ARNc para la PPII marcada con UTP-digoxigenina, como la del receptor de TRHR1 marcada con UTP³⁵S. Transcurrido el tiempo de hibridación se realizaron los lavados de posthibridación y se reveló la señal para la sonda de PPII (digoxigenina). Posteriormente los tejidos se cubrieron con una capa de parlodión 2% en acetona y se dejaron secar en condiciones libres de polvo. Inmediatamente después, se cubrieron con emulsión autoradiográfica. La exposición se mantuvo durante un mes y medio, se reveló la señal autoradiográfica y los tejidos se montaron con glicerol 50% en PBS.

6.16. Análisis de la señal

Los tejidos fueron examinados utilizando un sistema de análisis de imágenes (Mercator; Explora Nova, La Rochelle, France) y un microscopio Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara de video (Sony, ExwaveHAD color video camera). Los límites de cada región fueron determinados utilizando las secciones correspondientes del atlas de Paxinos y Watson (2005). Para la cuantificación de las células positivas, las regiones fueron particionadas en secciones de 120 x 120 μm^2 o 60 x 60 μm^2 . Se realizó el conteo de un cerebro de rata hibridado con el ARNm de la PPII y otro hibridado tanto con el ARNm de la PPII como con el del TRHR1. En el primer caso, se cuantificó el 20% (cada cinco cuadrantes) de los cuadrantes de cada región, mientras que en el segundo, con el fin de generar un mapa preciso de la distribución de la colocación de estos mensajeros, se cuantificó el 100 %.

El conteo de células positivas al ARNm de la PPII y/o del TRHR1 se realizó en campo claro a un aumento de 40X. Las células positivas al ARNm de la PPII fueron identificadas por la tinción perinuclear con hematoxilina y la presencia de por lo menos 4 granos de plata generados por la hibridación del ARNm de la PPII (³⁵S). Adicionalmente, con el fin de profundizar en esta distribución, se generaron tres categorías arbitrarias: señal baja, de 4-10 granos de plata; señal moderada, de 11-15 granos de plata; y señal elevada, de 16 ó más granos de plata. La hibridación *in situ* sencilla del ARNm del TRHR1 no fue contabilizada. Las células que coexpresaron el ARNm de la PPII y del receptor de TRHR1 fueron identificadas por el precipitado morado perinuclear generado por el marcaje del ARNm de la PPII con digoxigenina y

por lo menos por 4 granos negros sobre el núcleo que corresponden al los granos de plata generados por la hibridación con el ARNm de TRHR1 (^{35}S). Con el fin de conocer el grado de concentración de ARNm del TRHR1 que colocaliza más frecuentemente con el mensajero de la PPII, se generaron categorías arbitrarias que dividieran el mensajero del TRHR1 en concentración baja (4-10 granos de plata) y alta (1 ó más granos de plata).

7. RESULTADOS

El mapeo realizado en este estudio cubre el septum de la rata en su totalidad, desde el nacimiento de los núcleos septohipocampales, hasta la desaparición de los núcleos septotriangulares y describe la distribución de los mensajeros de la PPII y del TRHR1 en forma individual y posteriormente la colocalización observada entre ellos. En todos los casos, las imágenes o datos mostrados refieren a sitios con señal significativa, a menos de que se indique lo contrario. Las coordenadas utilizadas para delimitar estas regiones se obtuvieron de Paxinos y Watson (2005). La distribución obtenida de ambos mensajeros demostró ser de baja proporción (contra otros mensajeros) y variable a lo largo del septum; sin embargo, presentan un patrón similar, existiendo núcleos bien definidos en donde su concentración es elevada y en la mayoría de ellos existe colocalización de los mensajeros, sugiriendo que en estas regiones la PPII puede estar regulando la actividad del TRH.

7.1. Implementación de la hibridación *in situ*

Para detectar el ARNm de la PPII y del TRHR1 se hicieron hibridaciones *in situ* sencillas con sondas antisentido marcadas con UTP-³⁵S y con sondas marcadas con UTP-digoxigenina. A la par y con el fin de tener un control negativo, se corrieron hibridaciones en cortes adyacentes con las sondas sentido. Las hibridaciones con el ARNm de la PPII presentaron señal positiva en la corteza cerebral, hipocampo, corteza piriforme y septum, tanto con las sondas marcadas con radioactividad (Fig 7), como con las sondas marcadas con digoxigenina (Fig 8, sólo se muestra el hipocampo). Para el caso del ARNm de TRHR1, las hibridaciones con sondas marcadas con digoxigenina únicamente presentaron señal positiva en forma clara en el giro dentado y en la banda diagonal de Broca, mientras que el resto de los núcleos generalmente presentaron señal baja y difícil de observar (datos no mostrados). En tanto, las sondas anti-TRH marcadas con radioactividad fueron fácilmente detectables. Debido a lo anterior, la doble hibridación *in situ* se realizó con sondas de ARNm de PPII marcadas con digoxigenina y sondas de ARNm de TRHR1 marcadas con ³⁵S.

Las hibridaciones realizadas con sondas sentido de PPII y TRHR1 marcadas radioactivamente no presentaron señal inespecífica importante. Por parte de las sondas sentido, si bien muchos tejidos estuvieron completamente limpios, en algunos casos

observamos que la sonda sentido mostraba señal falsa positiva, probablemente por unión inespecífica. Debido a ello, fue necesario realizar controles que aseguraran que la señal observada con la sonda antisentido de la PPII marcada con digoxigenina fuera específica. Para ello, se llevó a cabo el desplazamiento de la sonda antisentido de PPII marcada con UTP-digoxigenina, con un exceso (50 veces) de la sonda fría antisentido de la PPII. En estos tejidos no se observó señal positiva. Otro control fue el revelado de tejidos hibridados con la sonda antisentido de la PPII en ausencia del anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina. En este caso tampoco se detectó señal positiva (datos no mostrados). Estos controles demostraron que la hibridación del ARNm de PPII marcada con digoxigenina fue específica. Los mismos controles se utilizaron en la doble hibridación *in situ*.

Adicionalmente, en todas las hibridaciones se emplearon regiones en las cuales se ha demostrado en forma previa la presencia del ARNm para la PPII o de TRHR1, sirviendonos como control positivo. En el caso de la hibridación de la PPII se utilizó la segunda región del cuerno de Ammon (CA2) (Heurer *et al.* 1998, Heuer *et al.* 2000) y por parte de la hibridación de TRHR1 la parte granular del giro dentado (GrDG) (Calza *et al.* 1992). Esta misma región resultó tener una alta colocalización, por lo que fue el control de la doble hibridación *in situ*; sin embargo, existieron regiones con mayor porcentaje de colocalización (gráfica 2).

7.2. Distribución del ARNm del TRHR1

La hibridación *in situ* realizada indicó que el ARNm del TRHR1 presenta una distribución heterogénea, ya que dentro de una región dada, existen zonas específicas en las que se concentra la señal mientras que en otras puede ser sumamente baja o nula, siendo el principal ejemplo el MSDBB.

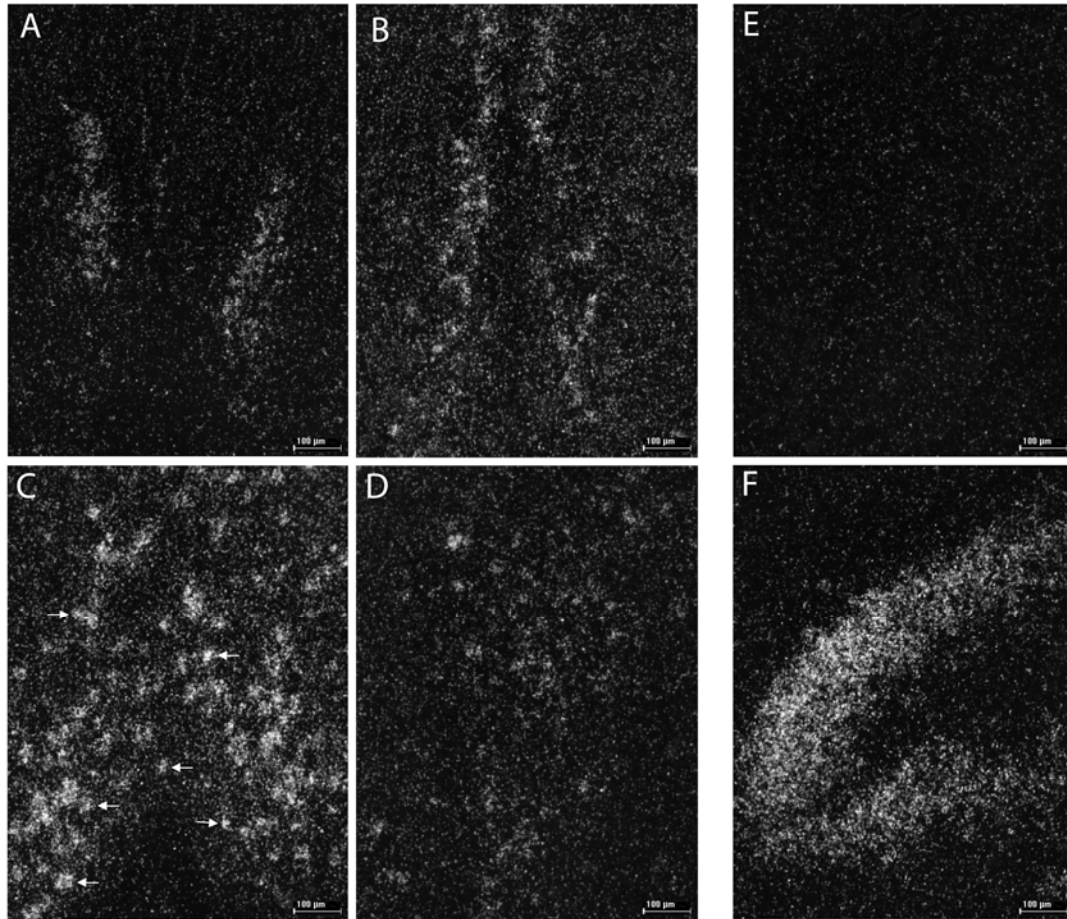


Figura 5. Imágenes representativas tomadas en campo oscuro de cortes hibridados con la sonda antisentido de ARNm de TRHR1 (^{35}S) en la región anterior del núcleo Shi (A), septum medio (B), banda diagonal de Boca (C), banda diagonal de Broca, parte horizontal (D), septum lateral. Adicionalmente se muestra como control la parte granular del giro dentado hibridado con la sonda sentido (E) y antisentido (F). Los puntos blancos corresponden a los precipitados de plata que indican la señal radioactiva de la sonda. Nótese que el MSDBB fue la región con mayor concentración e intensidad de señal y que presentó cúmulos neuronales con alta concentración de señal, denotados con flechas. Los rangos de bregma analizados se indican en el texto

En un bregma aproximado de 2.20 mm, los núcleos septohipocampales aparecen, y con ellos una concentración elevada de mensajero de TRHR1 que se mantiene constante y distribuída por todo el núcleo en forma homogénea (Fig. 5). Esta concentración elevada se mantuvo hasta 1.76 mm de bregma. A medida que la parte vertical del complejo septum medio-banda diagonal de Broca apareció, la señal del ARNm del TRHR1 se intensificó y llegó a su máximo en un rango de bregma aproximado de 1.30 mm y 1.20 mm (Fig. 5 B y C). Esta zona presentó la mayor concentración de ARNm de TRHR1 de todo el septum. En forma interesante, esta región de la DBB presenta agregados neuronales con una alta concentración de ARNm de TRHR1 (Fig. 5 y 6). Como es de notar, el rango de bregma que presentó la máxima concentración de mensajero es sumamente estrecho, existiendo variaciones elevadas con el cambio de unas cuantas decenas de micra (hay que recordar que los cortes son de 20 μm de grosor). Notoriamente, esta zona de máxima expresión es una zona de transición en la que la

parte horizontal de la banda diagonal de Broca aparece. Al hacerlo, la distribución del mensajero cambia y se redistribuye principalmente en una fina línea paralela a su borde ventral que continua hasta la desaparición del complejo MSDBB. Posteriormente, con la aparición de la fimbria/fórnix (bregma aproximado de - 0.18 mm) el mensajero del TRHR1 intensificó su señal, distribuyéndose en sitios cercanos a ella, como: el LSI, LSV, el núcleo septofimbrial (Sfi) y alrededor de la comisura anterior (Fig. 5D). Finalmente, la señal disminuyó con la cercanía de los núcleos triangulares del septum y luego desapareció.

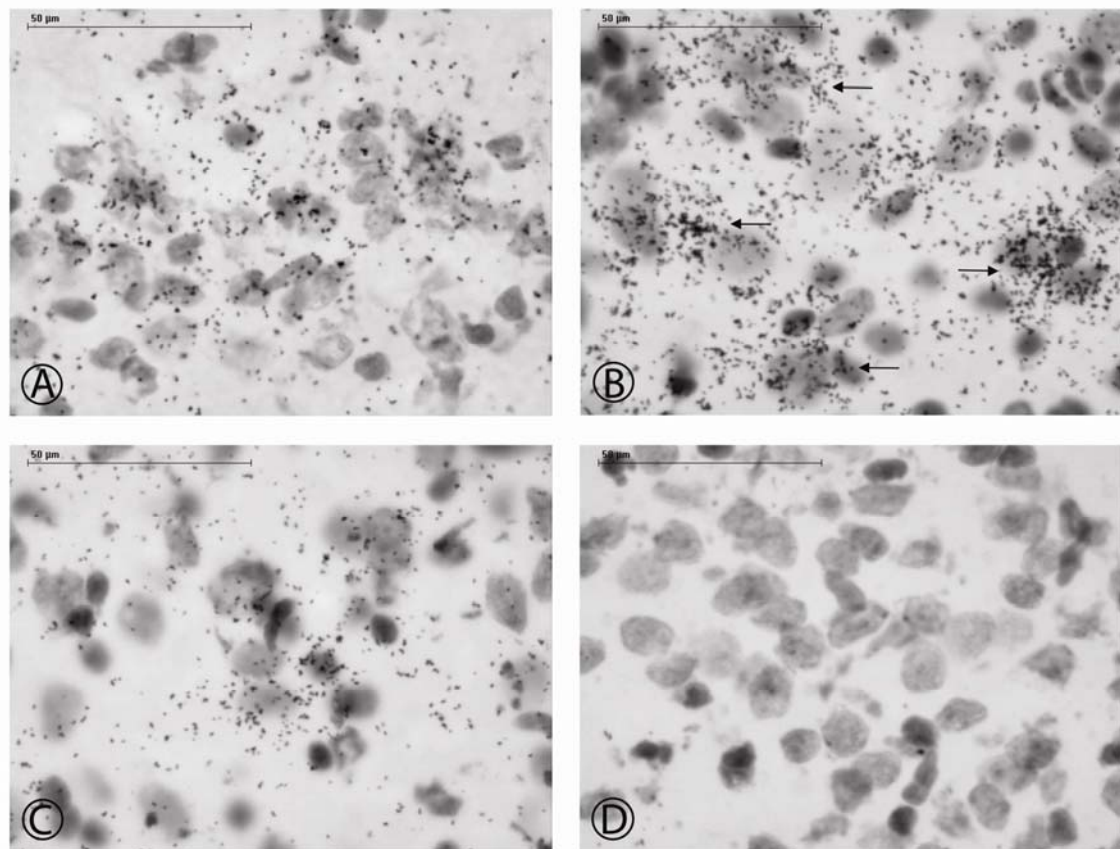


Figura 6. Imágenes representativas en campo claro de cortes hibridados con la sonda antisentido de ARNm de TRHR1 (^{35}S) en la región anterior del núcleo Shi (A), banda diagonal de Boca (B), septum lateral (C), y con la sonda sentido de ARNm TRHR1 (^{35}S) en el giro dentado, parte granular (D). Los núcleos de las neuronas (círculos grisáceos) están teñidos con hematoxilina y los granos de plata sobre de ellos (tonos grises y negros) corresponden a la señal radioactiva de la sonda. Nótese que la DBB presenta cúmulos neuronales (denotados con flechas) con concentraciones sumamente elevadas de granos de plata y que la densidad de estos, es superior a la observada en cualquier otra región del septum.

7.3. Distribución del ARNm de la PPII

A diferencia del mensajero del TRHR1, la distribución del ARNm de la PPII a lo largo del septum en general es homogénea y de baja señal. Las regiones con mayor concentración de mensajero fueron el septum lateral, el núcleo septofimbrial y el núcleo

septohipotalámico (Fig. 7). Estas regiones fueron contabilizadas esperando obtener datos exactos de la concentración del ARNm en ellas. Adicionalmente, aunque la señal del complejo MSDBB en general fue baja, fue contabilizada debido a que es el sitio más sensible para generar el efecto analéptico del TRH.

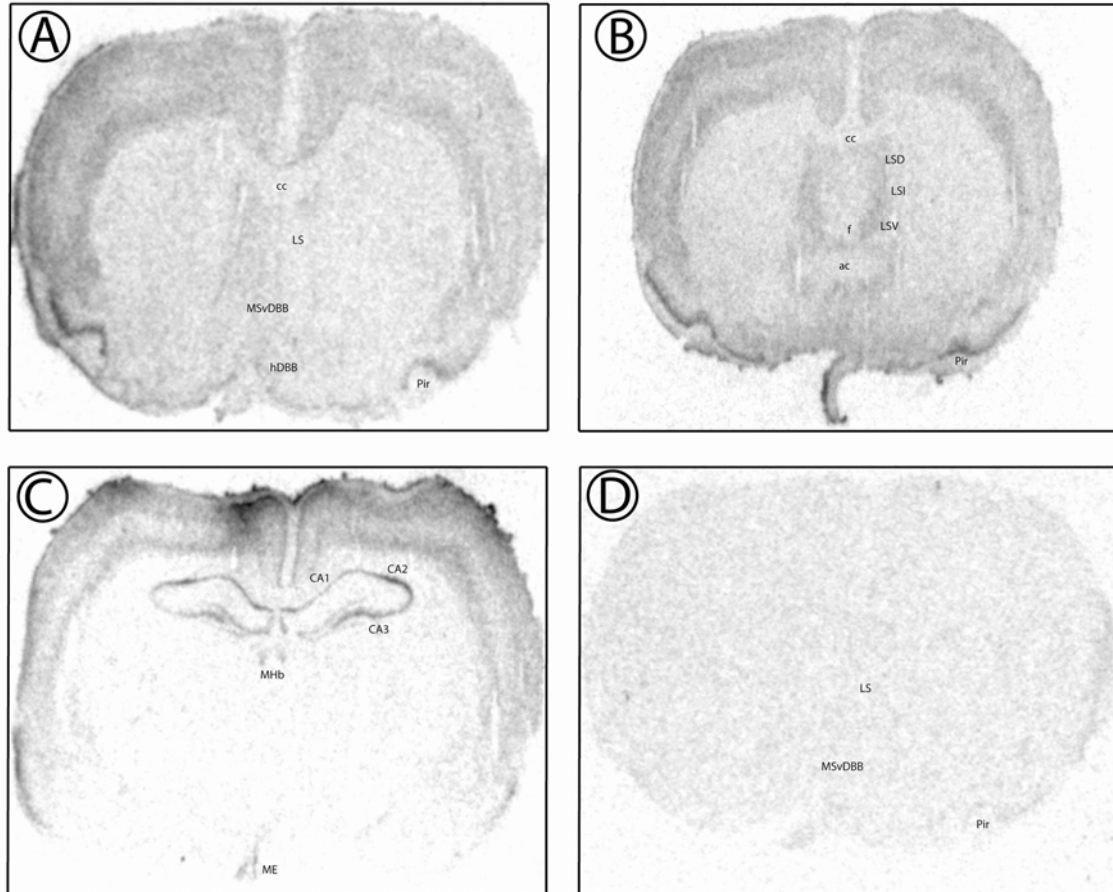


Figura 7. Macroautoradiografía de cortes coronales cerebro de rata hibridados con la sonda antisentido de ARNm de PPII (^{35}S) (A-C); y la sonda sentido (D). El tiempo de exposición fue de 7 días. **ac**, comisura anterior; **CA1**, primera sección del cuerno de Ammon; **CA2**, segunda sección del cuerno de Ammon; **CA3**, tercera sección del cuerno de Ammon; **cc**, *corpus callosum*; **f**, fórnix; **hDBB**, banda diagonal de Broca, parte horizontal; **LS**, septum lateral; **LSD**, septum lateral, parte dorsal; **LSI**, septum lateral, parte intermedia; **LSV**, septum lateral, parte ventral; **ME**, eminencia media; **MHb**, habenula media; **MSvDBB**, complejo septum medio-banda diagonal de Broca, parte vertical; **Pir**, corteza piriforme.

En esta forma, se observó que de la población total de neuronas del MSDBB (rango contabilizado, 1.30 mm a 0.98 mm), un promedio de 11.9% a 13.6% es positiva al ARNm de la PPII y que la mayoría de ellas presentan niveles bajos de mensajero (gráfica 1). Como dato adicional, pudimos observar pequeños grupos de neuronas con concentraciones significativas de mensajero, frecuentemente localizadas en la banda diagonal de Broca.

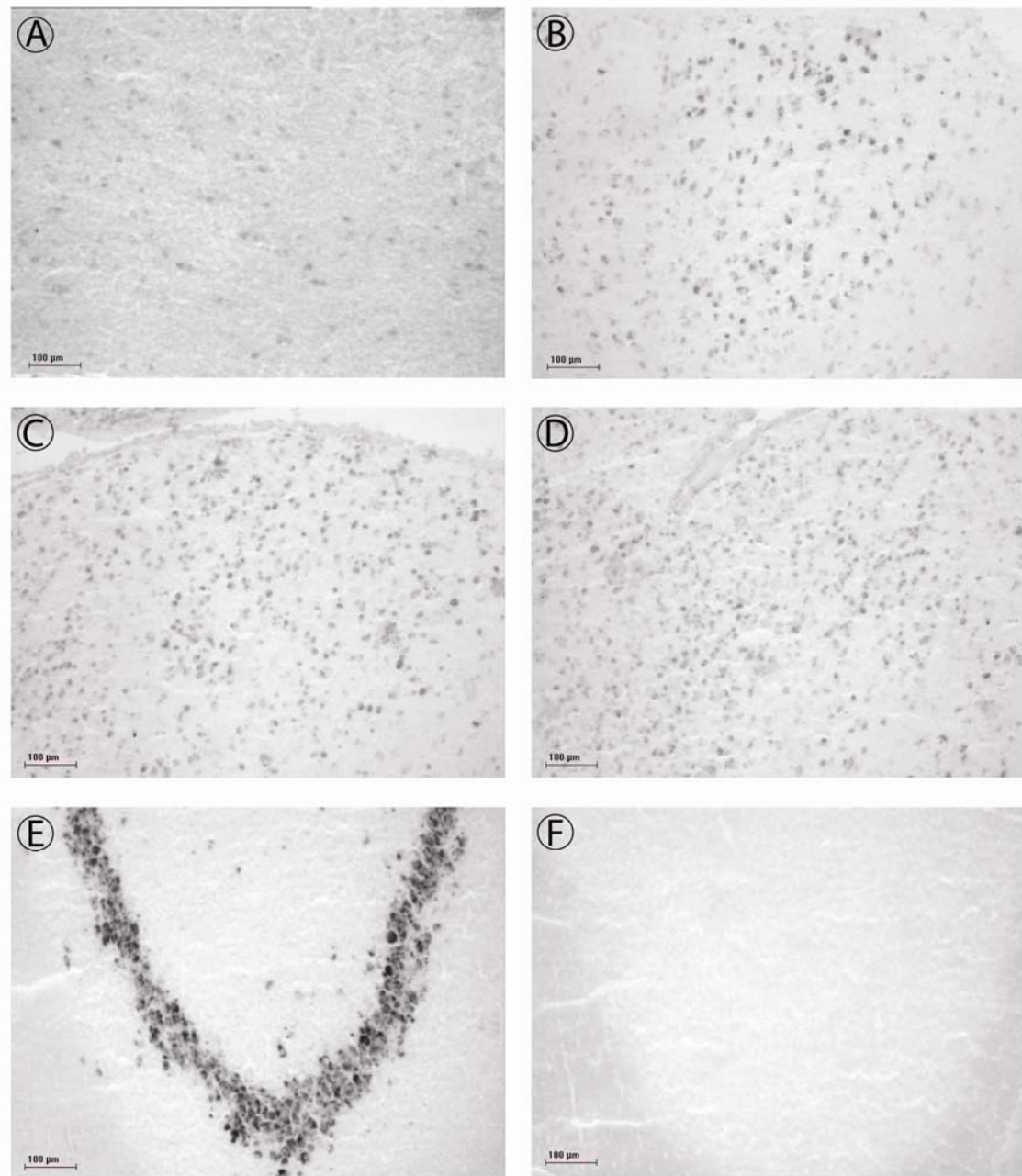
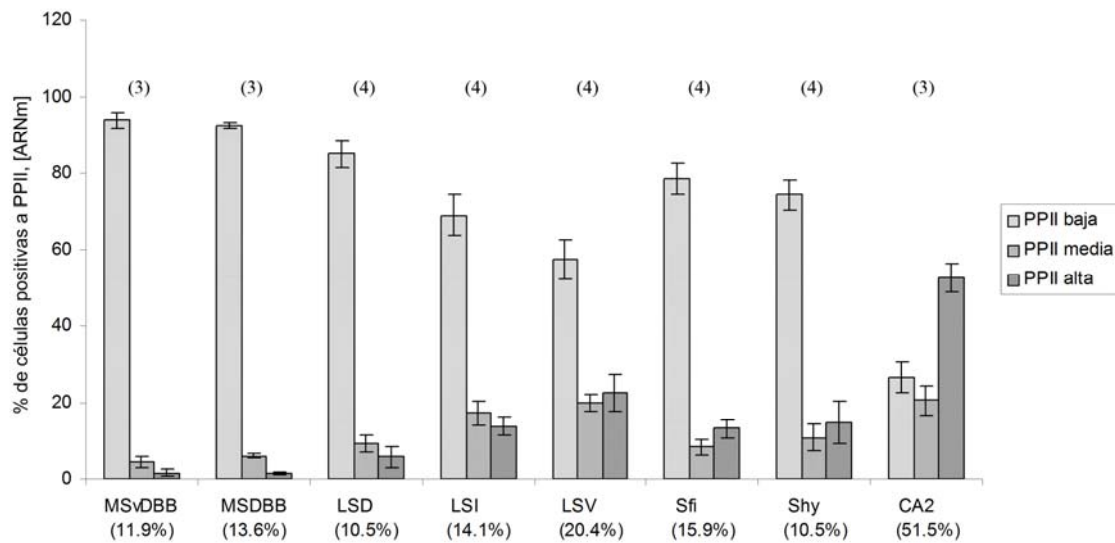


Figura 8. Imágenes en campo claro de cortes coronales de cerebro hibridados con la sonda de antisentido de ARNm de PPII (Digoxigenina) en el septum de rata e hipocampo. Los puntos oscuros demuestran el precipitado perinuclear por la actividad de la fosfatasa alcalina. MSDBB (A), LSD (B), LSI (C), LSV (D), CA2 (E) y CA2 (sentido) (F). Las imágenes están ordenadas de menor (A) a mayor concentración de señal (E). Es de notar la homogeneidad de la distribución en cada región.

Por parte del septum lateral, de los núcleos septofimbriales y septohipotalámicos (Shy), el porcentaje de células positivas al ARNm de la PPII fue muy elevado en un corto rango de bregma localizado entre - 0.14 mm a - 0.20 mm aproximadamente (Fig. 7B). Se observó que la distribución del ARNm en el LS es heterogénea, ya que existen diferencias significativas entre sus subdivisiones. Sin embargo, dentro de ellas, la distribución fue homogénea (Fig. 8). Los sitios con mayor densidad de células positivas al ARNm de PPII fueron el LSV, LSI y el núcleo Sfi. En forma notoria, se observó que

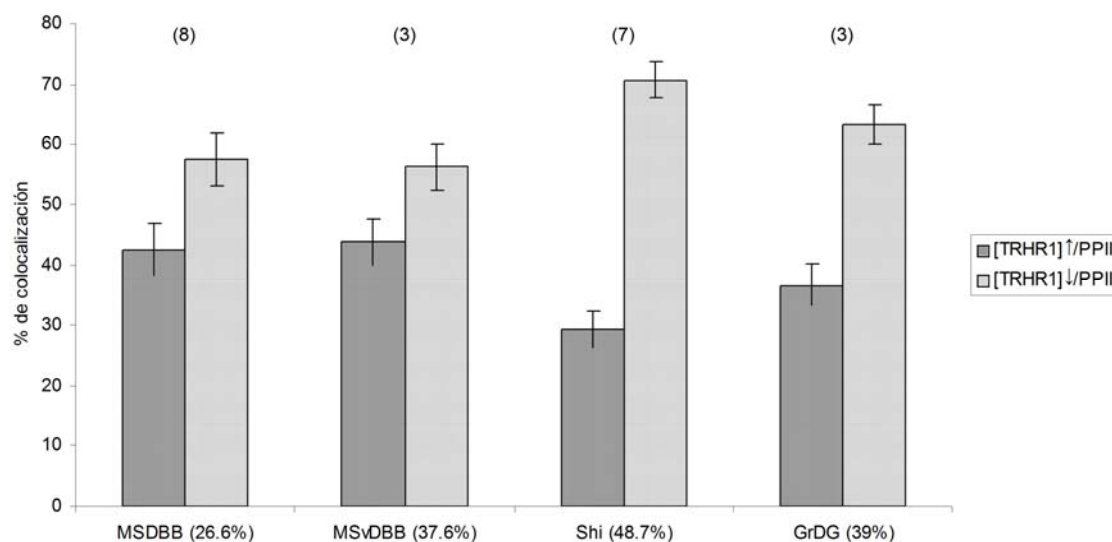
el LSD y el núcleo Shy presentan una expresión significativamente menor al resto de las regiones analizadas en este mismo rango de bregma (gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución del ARNm de la PPII en el septum. Las barras corresponden a los promedios (\pm e. s. m.) de los porcentajes de células positivas a PPII, separadas en baja, media, alta densidad respecto a población total de células PPII positivas. Los números entre los paréntesis inferiores denotan el porcentaje de células positivas a PPII respecto al total de núcleos celulares contados. Los números entre los paréntesis superiores indican la n de cortes analizados. El rango de bregma analizado se indica en el texto.

7.4. Colocalización de los ARNm de la PPII y del TRHR1

Los resultados obtenidos con las hibridaciones *in situ* simples demostraron que la señal de ambos mensajeros está presente en forma significativa en el septum lateral y en los núcleos septohipocampales anteriores en un rango de bregma muy similar. También se observó que aunque el nivel de intensidad del mensajero de la PPII era mucho mas bajo que el del TRHR1 en el complejo MSDBB, la distribución de ambos era similar. Lo anterior indicaba una alta probabilidad de colocalización, pero no lo demostraba. Por ende, se realizó una doble hibridación *in situ* que lo hiciera y los datos obtenidos se contabilizaron para conocer que tan común es la colocalización. Los datos obtenidos indicaron que los mensajeros colocalizan en todas las regiones antes mencionadas en forma significativa (gráfica 2).



Gráfica 2. Colocalización del ARNm de TRHR1 y del ARNm de PPII. Los histogramas muestran los promedios (\pm e. s. m.) de los porcentajes de colocalización, divididos en concentraciones elevadas y bajas de ARNm de TRHR1, respecto a la colocalización total. Los números denotados entre los paréntesis inferiores indican el porcentaje de colocalización total respecto a las células totales positivas al ARNm de PPII. Los números entre los paréntesis superiores indican la n de cortes analizados. El rango de bregma analizado se indica en el texto.

Los núcleos septohipocampales presentaron el nivel de colocalización más elevado en todo el septum, siendo su índice de 48.7 % (porcentaje de células PPII positivas que expresan TRHR1) (bregma 2.12 mm a 1.76 mm). De este porcentaje, el 29.3% de las neuronas positivas a PPII colocalizó con mensajero elevado de TRHR1 (gráfica 2). En el caso del MSDBB, la hibridación *in situ* simple del TRHR1 indicó que el ARNm del TRHR1 se concentra mayoritariamente en la hDBB (Fig. 9); por ello, el complejo MSDBB se dividió en dos zonas, antes y después de la aparición de esta zona. Adicionalmente, para conocer la diferencia de concentración entre la hDBB y el MSvDBB se subdividió el complejo MSDBB en estas dos regiones y se contabilizó (gráfica 3).

Los resultados obtenidos indicaron que en los cortes en los cuales sólo está presente el MSvDBB (1.3 mm y 1.20 mm de bregma), el 37.6% de las neuronas que expresan a la PPII colocalizan al ARNm del TRHR1. Al aparecer la hDBB, el complejo entero del MSDBB (bregma 1.12 mm a 0.8 mm) tuvo un 26.5% de los núcleos positivos a PPII que colocalizaron con el mensajero del TRHR1. Sin embargo, al dividir el complejo en dos, se observa una diferencia significativa entre el índice de colocalización en la hDBB y en el MSvDBB, siendo en la primera región del orden de 35%, mientras que en la segunda sólo del 20.5% (gráfica 3). Adicionalmente se observó que el porcentaje de células positivas a PPII que expresan TRHR1 elevado es mayor en la hDBB (Fig. 10), siendo de un orden del 45.5%, mientras que el MSvDBB fue del 39.8% (gráfica 3).

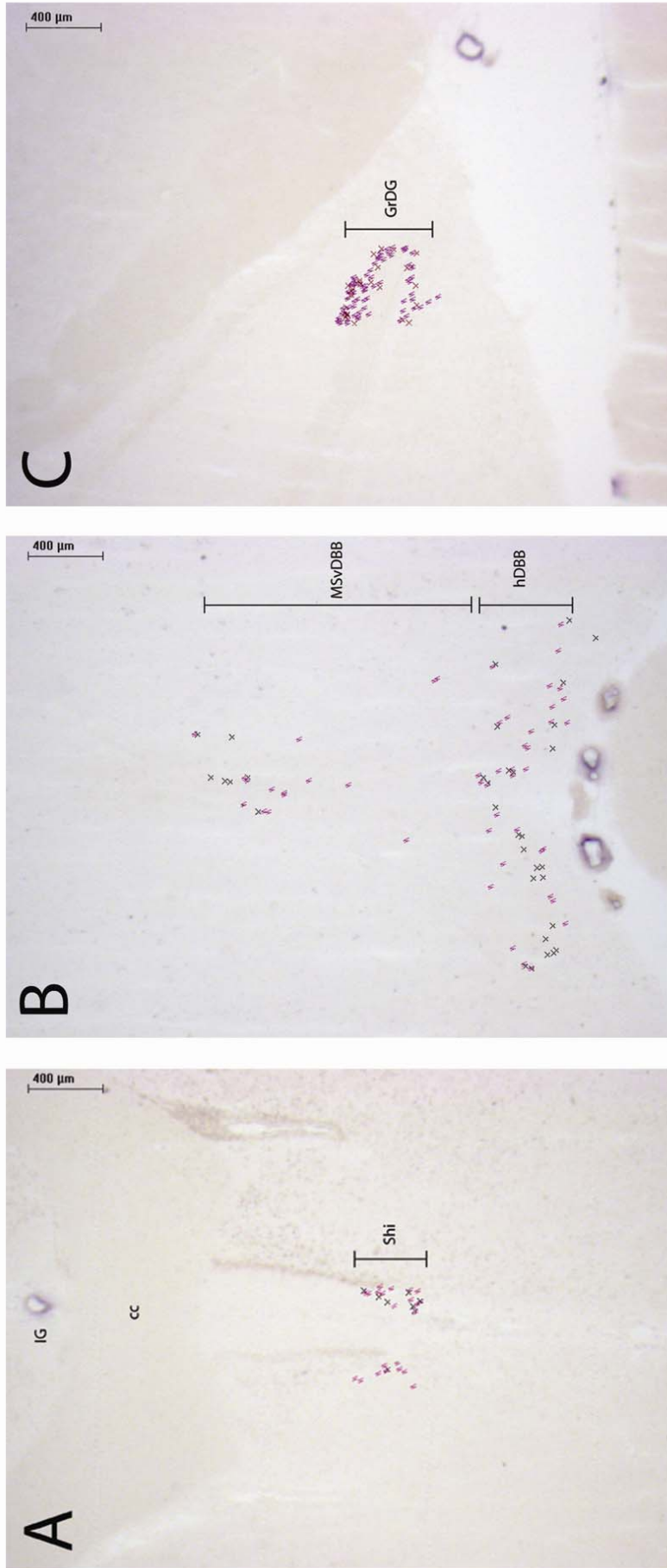
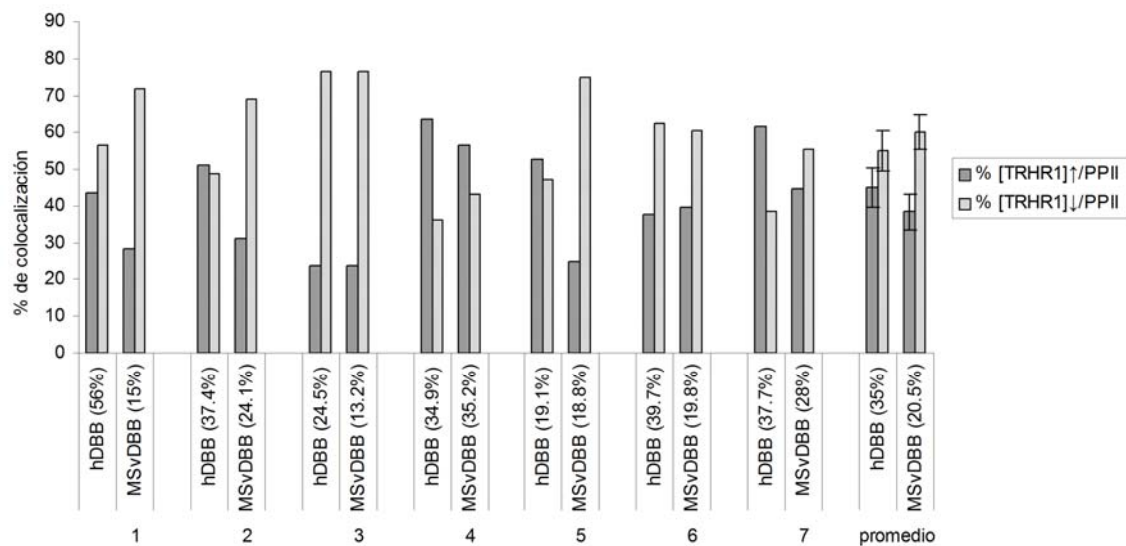


Figura 9. Mapas representativos de la distribución de la colocalización del ARNm de la PPII con el del TRHR1 en el núcleo septohipocampal (Shi) (A), complejo septum medio-banda diagonal de Broca (MSvDBB) (B) y parte granular del giro dentado (GrDG) (C). Los mapas fueron realizados con el programa Mercator al momento de contabilizar los datos de la colocalización y demuestran la distribución específica de los somas de las neuronas positivas a la colocalización. Nótese la diferencia en la distribución del hDBB y MSvDBB. El símbolo 4 denota la concentración baja de ARNm de TRHR1 (4-10, granos de plata) y el símbolo x denota concentración alta (10 ó mas granos de plata).



Gráfica 3. Diferencia en la colocación del ARNm de TRHR1 y ARNm de PPII a lo largo del complejo MSDBB. Los histogramas representan los porcentajes de colocación respecto a la colocación total de 7 cortes (números inferiores) de cerebro hibridados entre 1.12 mm y 0.8 mm de bregma. Los porcentajes fueron divididos en concentraciones elevadas y bajas de ARNm de TRHR1. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de colocación total contra el total de células positivas a PPII que expresan al TRHR1 en la subregión dada. Adicionalmente se muestra el promedio (\pm e. s. m.) de los 7 cortes para las dos subregiones hDBB y MSvDBB.

En forma interesante, se observó que aunque hay pocas neuronas fuertemente positivas al ARNm de la PPII en el MSDBB, las existentes, tienden a colocarse en forma frecuente con ARNm de TRHR1 de concentraciones elevadas. En cambio, las neuronas más positivas al TRHR1 pueden estar o no colocadas con células positivas al mensajero de la PPII. Otro punto importante es la existencia de cúmulos neuronales de neuronas frecuentemente en la DBB, pero no en el MS, con tendencia a presentar una colocación de señales elevadas por ambos mensajeros (Fig. 10).

Finalmente se observó colocación en el núcleo septofimbrial, en el septum lateral intermedio, en el área preóptica medial y alrededor de la comisura anterior (bregma aproximado de -0.18 mm). Lamentablemente, el limitado número de cortes impidió su conteo y por lo tanto no se indica la incidencia de colocación. En esta forma, se observa que en el septum de rata macho, la mayoría de los núcleos que presentan mensajero de PPII, presentan alta concentración de ARNm de TRHR1 y tienden a colocarse.

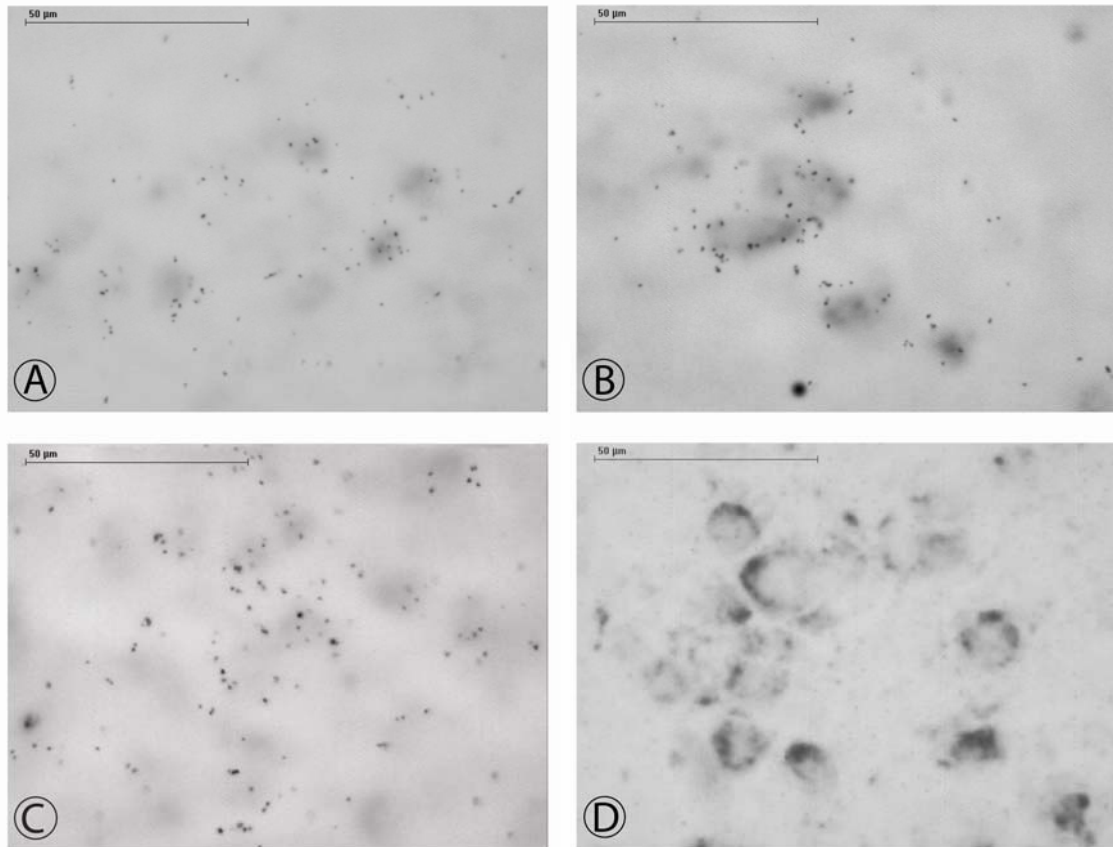


Figura 10. Imágenes representativas en campo claro de cortes hibridados con sondas antisentido de TRHR1 (^{35}S) y de PPII (Digoxigenina) en la región anterior del núcleo Shi (**A**), banda diagonal de Broca (**B**), parte granular del giro dentado (**C**), y de sonda sentido de TRHR1 (^{35}S) con sonda antisentido de PPII (digoxigenina) en la banda diagonal de Broca (**D**). Los somas de las neuronas están marcados por un precipitado, producto de la acción de la fosfatasa alcalina, indicando la distribución del ARNm de PPII y los granos de plata demuestran la concentración del ARNm de TRHR1. (**B**) y (**D**) muestran neuronas agrupadas encontradas en la DBB, pero no en el MS, con alta señal de PPII (**D**) o de ambos mensajeros (**B**).

8. DISCUSIÓN

La hipótesis de que los neuropéptidos juegan papeles neuroregulatorios importantes animales en estado narcoléptico se basa, en parte, en que este estado puede ser alterado por algunos péptidos. Dentro de ellos, el TRH ha probado revertir algunos de estos efectos en forma eficaz. Por ello, se estudió la distribución de los ARNm de elementos que pudieran interactuar en la regulación del efecto analéptico como es la PPII y el TRHR1 en el septum de rata. En esta forma, se pueden conocer los sitios precisos donde se sintetizan los productos proteicos y así, obtener una idea del sitio donde el TRH puede (mas no lo demuestra en forma tajante) ejercer su efecto analéptico y como puede ser regulado.

Los resultados obtenidos muestran la distribución de los ARNm de la PPII y del TRHR1 en forma detallada a lo largo del septum, indicando las variaciones existentes dentro de un mismo núcleo a diferente bregma. En esta forma, se profundizó en las distribuciones generales descritas por otros grupos (Claza *et al.* 1992, Zabavnik *et al.* 1993, Heuer *et al.* 2000) y se presenta en forma meticulosa el patrón de colocación entre los ARNm de la PPII y del TRHR1 en esta región. Observamos que existen regiones con una distribución homogénea de mensajero, en las que la disminución o aumento de expresión es en forma gradual y otras en las que puede haber una variación abrupta como es el caso del ARNm del TRHR1 en el MSDBB. Adicionalmente, se pudo generar un mapa de la distribución de los mensajeros de la PPII y del TRHR1 que indica un patrón similar a lo largo del septum. Cabe mencionar que debido a la existencia de cambios de concentración de los mensajeros a lo largo del septum, no es posible indicar que una región en su totalidad presenta un grado dado de expresión de mensajero. Por lo tanto, en este estudio se describen coordenadas precisas que delimitan el rango en el que se encuentra la mayor expresión de mensajero dentro de un núcleo dado.

8.1. Distribución del ARNm del TRHR1 vs ensayos de unión de TRH a sus receptores

Los resultados del mapeo generado en este estudio son consistentes con otros análisis generales de hibridación *in situ* descritos por otros grupos a lo largo de todo el SNC (Zabavnik *et al.* 1993, Calza *et al.* 1992, Heuer *et al.* 2000). Estos estudios indican un

patrón similar de distribución en los núcleos septohipocampales anteriores y en el complejo MSDBB. Sin embargo no reportan la distribución en forma precisa y sólo un grupo reporta la expresión significativa de mensajero de TRHR1 en el septum lateral (Zabavnik *et al.* 1993). Dado que la información obtenida por la hibridación *in situ* es de resolución celular, se pueden indicar los sitios de síntesis de ARNm más importantes de un núcleo dado. En esta forma, al compararlo con los ensayos de unión del TRH a sus receptores, se puede tener una idea de donde proviene la proteína observada; sin embargo, se tendrá que dejar abierta la posibilidad de que la proteína registrada por dichos ensayos pueda provenir de otros sitios. Por otro lado, la comparación de la hibridación *in situ* con estudios inmunohistoquímicos puede indicar en forma más precisa si la proteína observada es producto del ARNm observado. Lamentablemente, existen muy pocos estudios inmunohistoquímicos sobre la distribución de los receptores del TRH y la información proporcionada por ellos es sumamente escasa (Mitsuma *et al.* 1999).

La distribución generada por los ensayos de unión de TRH a sus receptores (Manaker *et al.* 1984, Mantyth y Hunt 1985) sobrelapa con la obtenida por nuestra sonda de ARNm, indicando que el producto proteico observado probablemente sea de origen local. Sin embargo, existen variaciones entre los niveles observados de mensajero y el producto proteico, por lo que no es posible confirmar que esto se cumpla en todos los casos. El complejo MSDBB presenta un marcaje de mensajero y de producto proteico intenso (Sharif y Burt 1985, Simasko y Horita 1984). Sin embargo, parece no existir una correlación en la concentración de ARNm observado en la parte horizontal y vertical de la banda diagonal de Broca y el nivel de proteína reportado, ya que la vDBB tiene mayores niveles de proteína que la hDBB (Manaker *et al.* 1985), mientras que a nivel de mensajero ocurre lo contrario. Por otro lado, Mantyth y Hunt (1985), mencionan que el septum medio presenta niveles moderados a bajos de receptor y no hacen referencia alguna a la banda diagonal de Broca. Estas diferencias en el nivel de mensajero y de proteína pueden ser explicadas por el transporte de esta última através de las íntimas conexiones del MS con la DBB que forman el complejo (Paxinos 1995). Otra posible explicación es que la diferencia observada en el MSvDBB se deba a la presencia del receptor tipo 2 del TRH (TRHR2), el cual presenta niveles moderados de ARNm en el hDBB (O'Dowd *et al.* 2000) y de moderados (Heuer *et al.* 2000) a altos (Sharif y Burt 1985) en el MS. En esta forma, el producto proteico registrado en los ensayos de unión puede ser tanto producto del ARNm de TRHR1 como de TRHR2, lo que puede generar

una diferencia importante en el complejo. No obstante, los estudios de inmunohistoquímica únicamente indican la presencia del TRHR2 en el MS y no en la DBB, por lo que es posible que la proteína observada en la DBB sea principalmente del TRHR1, mientras que la observada en el MS sea del TRHR2.

El núcleo septohipocampal presenta niveles un poco menores de mensajero de TRHR1 que el complejo MSDBB y el producto proteico tiene concentraciones variables (Mantyth y Hunt 1985, Manaker *et al.* 1984, Pazos *et al.* 1985). Finalmente, en el LS se observó un corto rango con señal significativa de ARNm aunque aparentemente mas baja que el MSDBB y el nivel de proteína registrada es de moderado a bajo (Mantyth y Hunt 1985). Sin embargo, las columnas del fórnix presentan niveles de proteína elevados (Manaker *et al.* 1984). Por otro lado, los estudios inmunohistoquímicos reportan la presencia del TRHR2 en el LS (Mitsuma *et al.* 1999), dejando la posibilidad de que la proteína registrada por los ensayos de unión sea de ambos receptores. Lamentablemente, ninguno de estos ensayos indica la ubicación exacta en que se expresa la proteína y por lo tanto, es posible que las zonas que registraron estén ubicadas en regiones distintas dentro del septum lateral.

Finalmente, se ha reportado señal elevada de receptor en el núcleo septohipotalámico, mientras que nuestro estudio indicó niveles moderados del ARNm de TRHR1. Cabe agregar que a excepción del MS y la hDBB, no hay registro positivo de ARNm de TRHR2 en alguna otra región del septum (Heuer *et al.* 2000 y O'Dowd *et al.* 2000), sugiriendo que los niveles de proteína reportados fuera de este complejo refieren únicamente a la distribución del TRHR1 y no del TRHR2.

En todos los casos los niveles absolutos de receptor reportados por diferentes grupos varían. Esto puede deberse a condiciones distintas en el estado fisiológico del animal al momento de sacrificarlo o simplemente a que las zonas registradas no son las mismas, ya que estos estudios son muy generales, refiriendo al SNC en su totalidad y no al septum por si sólo. Adicionalmente, es claro que los datos de la hibridación *in situ* no son directamente comparables con los ensayos de unión, dado que la primera sólo detecta el sitio de expresión del gen, el cual generalmente ocurre en el soma neuronal y no detecta al receptor como tal, el cual puede migrar por medio de los axones o dendritas, restando producto proteico. Por otra parte, se sabe que existe un tercer tipo de TRHR registrado en *Xenopus* (Bidaud *et al.* 2002), el cual puede estar siendo registrado

por los ensayos de unión, pero no por la hibridación *in situ*, debido a que nuestra sonda consta de una secuencia específica y por lo tanto solo puede hibridar con el ARNm del TRHR1. Sin embargo, aunque existen variaciones entre el ARNm y la proteína, se demuestra que la distribución es similar, sugiriendo que por lo menos parte del TRHR detectado por los ensayos de unión es producto del mensajero observado en las mismas regiones y por lo tanto, que el receptor permanece en forma local, cercano a los somas de las neuronas que lo sintetizaron; además, esta información sugiere que los receptores son postsinápticos. Finalmente, hay que mencionar que Simasko y Horita (1984) registraron una disminución del 33% en la unión del TRH marcado radioactivamente a su receptor después de microinyectar ácido cáinico en el MSDBB. Dado que este ácido destruye preferentemente los cuerpos celulares, se concluye que parte de los receptores están en el soma de las neuronas y se sugiere que la mayoría de las terminales nerviosas que expresan al receptor de TRH proviene de otras regiones.

8.2. Distribución comparativa de los ARNm de TRHR1 y PPII

Como anteriormente se mencionó, la distribución de los mensajeros de TRHR1 y PPII presenta un patrón similar en la mayoría de los casos. Sin embargo, la intensidad de ambos elementos puede variar en el mismo sitio en forma significativa. El ejemplo más evidente de lo anterior ocurre en el complejo MSDBB, donde el marcaje del TRHR1 es intenso en bregmas y sitios específicos del complejo, mientras que en general el mensajero de la PPII es bastante bajo. No obstante, ambos mensajeros presentan una distribución similar y por lo tanto, este dato nos llevó a realizar una doble hibridación *in situ* que comprobara si colocalizan o no. A la fecha, no conocemos antecedentes de un estudio similar y por lo tanto, es la primera vez que se confirma la colocalización de estos dos mensajeros en alguna región del cerebro. En esta forma, se observó que todos los núcleos del septum que presentan mensajero de TRHR1 en forma significativa, presentan señal de PPII y que en todos ellos existe un grado de colocalización (porcentaje de células PPII positivas que expresan TRHR1) mayor al 20% (gráfica 2). Este alto grado de colocalización era poco esperado en el complejo MSDBB, ya que la intensidad del mensajero de la PPII resultó ser muy baja (gráfica 1). Adicionalmente, se esperaba registrar diferencias significativas en el mensajero de la PPII localizado en la hDBB y el MSvDBB; sin embargo, este no fue el caso (gráfica 1). No obstante, el MSDBB en su totalidad resultó estar entre los núcleos con mayor colocalización, sugiriendo una estrecha participación en el proceso de señalización y regulación del

TRH. Adicionalmente, pudimos notar que las pocas células con señal intensa de PPII tienden a colocalizar con el mensajero del TRHR1, mientras que el caso contrario puede o no ocurrir. Finalmente, sugerimos que los cúmulos neuronales observados frecuentemente en la DBB, pero no en el MS, con tendencia a presentar una colocalización de señales elevadas de ambos mensajeros son los responsables de formar el patrón observado en la hibridación simple del TRHR1 (Fig. 5C) y por lo tanto, representan una parte importante del mensajero total registrado.

Por otro lado, el núcleo septohipocampal mostró el índice de colocalización más elevado en todo el septum. Sin embargo, esto sólo ocurrió en las regiones anteriores, ya que al aparecer el complejo MSDBB y el LS, sus concentraciones fueron bajas. Lo anterior sugiere que sólo en las partes anteriores del núcleo septohipocampal la PPII regula los efectos del TRH.

En esta forma, se observa que en el septum, los sitios con señal significativa de ARNm de TRHR1 colocalizan con el de la PPII, apoyando la propuesta de Heuer *et al.* (2000), que asume que a diferencia de otras enzimas como la acetil colinesterasa, la PPII puede ser considerada como un marcador que refleja los blancos del TRH. Dado lo anterior, es plausible pensar que como ambos mensajeros están en las mismas células y por lo tanto tienen las mismas rutas de transporte fuera de su sitio de síntesis, deben mantenerse juntos incluso si son transportados a otras regiones. Por lo tanto, proponemos que la PPII es capaz de modular los efectos producidos por el TRH, hidrolizando parte de este y por lo tanto evitando que interactue con el TRHR1 septal. Un punto importante es el hecho de la reciente descripción de un subtipo de PPII conocido como PPII truncada (PPII*) debido a la ausencia de parte de su dominio C terminal (Chávez-Gutiérrez *et al.* 2005). La sonda utilizada no discrimina entre los ARNm que condifican para los dos tipos de proteína. Por lo tanto, es posible que la concentración de la PPII completa no se pueda inferir fácilmente de los resultados obtenidos.

8.3. Significado funcional y regulación del TRH en el septum

El presente estudio tuvo como propósito final indicar la distribución precisa del ARNm del TRHR1 y el ARNm de la PPII en el septum de rata para conocer mejor dónde interactúa el TRH con el TRHR1 y cómo puede ser modulado por la PPII en la generación del efecto analéptico. Por lo tanto, la discusión generada en esta sección

abarcará estos dos puntos y no se indagará, más que en una forma sumamente breve sobre otros aspectos modulados por el TRH en el septum.

8.3.1. Efecto y regulación en el MSDBB

El efecto analéptico del TRH puede ser reproducido al administrar el tripéptido directamente en el MSDBB o en regiones cercanas (Kalivas y Horita 1979) y se postula que en forma natural debe ser producido por el TRH liberado por diferentes terminales en esta región. Los presentes estudios sugieren que el receptor observado en los ensayos de unión es en parte producto del mensajero sintetizado en las zonas antes descritas, por lo que es posible especular que los receptores se localizan en la cercanía de los cuerpos celulares que los sintetizaron.

Los antecedentes del proyecto generan la posibilidad de que el TRH debe ser degradado por su enzima específica en esta región. El presente estudio demuestra la presencia de ARNm de PPII en el MSDBB con concentraciones principalmente bajas. Hay que recordar que los presentes estudios se realizaron en estado basal y no bajo el efecto de alguna droga psicotrópica, por lo que es factible que en un estado de narcolepsia, el mensajero de la PPII disminuya (y posiblemente que el ARNm de TRHR1 aumente) en forma significativa, con el fin de facilitar la señalización del TRH administrado o sintetizado por el animal en forma natural. Lo anterior es consistente con la evidencia generada por de Gortari *et al.* (2005), que indica que en otras regiones del cerebro el etanol regula en forma negativa la expresión del ARNm y la actividad de la PPII. En forma adicional, se ha reportado un aumento en el contenido de TRH y de su ARNm en el Hipocampo después del mismo tratamiento con etanol (de Gortari *et al.* 2000). En esta forma, se observa la necesidad de aplicar la misma metodología descrita en este trabajo e incluso ensayos de unión, para determinar si hay cambios en la concentración de mensajero y proteína en estados de narcolepsia. Adicionalmente, la administración de TRH en conjunto con inhibidores específicos de la PPII podría aumentar la eficiencia en la reversión de un estado narcoléptico.

El ARNm del TRHR1 por su parte presentó su máxima expresión en el MSDBB y aunque la concentración de ARNm de PPII fue baja, el nivel de colocalización fue de los más elevados en todo el septum, sugiriendo la PPII puede regular la generación del efecto analéptico mediado por el TRH. Dicho efecto ha probado tener un componente

colinérgico esencial, del cual existen múltiples evidencias (ver antecedentes) y por ello se ha supuesto que el TRH debe tener localizado a sus receptores en los somas de las neuronas colinérgicas del complejo MSDBB. Los resultados obtenidos por parte de este estudio apoyan lo anterior, demostrando concentraciones significativamente elevadas de ARNm de TRHR1 en regiones discretas ubicadas en la zona medial de este complejo, entre 1.30 mm y 1.12 mm de Bregma. Lo anterior sugiere que este rango es el sitio de máxima sensibilidad de la DBB al TRH, aunque es posible, dada la fina banda de ARNm de TRHR1 altamente concentrada en la hDBB (Fig. 9C), que se pueda revertir eficazmente la narcolepsia hasta los 0.8 mm de bregma. Sin embargo, es necesario realizar estudios de inmunohistoquímica en paralelo con estudios de hibridación para identificar el fenotipo de somas neuronales del MSDBB y confirmar si los mensajeros de los receptores y de la PPII se localizan en ellos y en qué proporción.

Por otro lado, hay que recordar que las neuronas colinérgicas son sólo uno de los tres tipos neuronales principales que proyectan al hipocampo por medio de la ruta septohipocampal y es difícil pensar que sólo un tipo neuronal pueda regular este efecto. Los otros dos tipos neuronales están conformados por neuronas glutamatérgicas y neuronas GABAérgicas, indicando que la ruta está conformada por lo menos, por un segundo tipo de neuronas excitatorias y uno de neuronas inhibitorias. Las neuronas glutamatérgicas se localizan con mayor abundancia en la DBB que en el MS (Colom *et al.* 2005) dictando la posibilidad de sean positivas al TRHR1 y a la PPII. Sus proyecciones hacia el hipocampo nacen del MS principalmente y hacen contacto en el CA1, CA3 y DG, formando el 23% de la ruta septohipocampal. A nivel del MSDBB se encuentran interconectadas formando una red, capaz de generar ráfagas excitatorias principalmente mediadas por receptores AMPA hacia otras neuronas glutamatérgicas, colinérgicas y GABAérgicas (Manseau *et al.* 2005). Estas conexiones se ven apoyadas por la proximidad de somas y dendritas de neuronas glutamatérgicas con somas y dendritas de neuronas con marcadores colinérgicos y GABAérgicos analizados por medio de microscopía confocal (Colom *et al.* 2005). A la vez, la red neuronal glutamatérgica es excitada por neuronas colinérgicas (Leranth y Kiss 1996) vía receptores muscarínicos (Manseau *et al.* 2005), sugiriendo que las neuronas colinérgicas activan la red glutamatérgica y que esta puede formar una red activa que se mantenga por sí sola en forma temporal.

Adicionalmente, las neuronas colinérgicas y glutamatérgicas envían axones que activan interneuronas GABAérgicas o de proyección (Colom *et al.* 2005), indicando que pueden regular su actividad. En forma importante, también existen evidencias de que el TRH modula los efectos de las neuronas GABAérgicas del MSDBB. La administración intraperitoneal de agentes que aumentan la transmisión de GABA inhibe la reversión del efecto analéptico del TRH en ratones sedados con etanol (Cott y Engel 1977), mientras que al introducir antagonistas de GABA se reduce la dosis necesaria para revertir el efecto de narcolepsia (Givens y Breese 1990a). Adicionalmente, la inactivación de la ruta septohipocámpal por medio de la administración de muscimol en el MS incrementa la potencia de los anestésicos generales en un $\geq 100\%$ (Ma *et al.* 2002). Finalmente, el etanol aumenta la inhibición de GABA en el MS (Givens y Breese 1990a) sugiriendo que las neuronas GABAérgicas locales del MSDBB regulan negativamente a las neuronas colinérgicas y glutamatérgicas del complejo en un estado narcoléptico, mientras que las neuronas colinérgicas encienden la vía para despertar al animal. Es de suma importancia recordar que el septum contiene neuronas GABAérgicas locales y de proyección al hipocampo y que es posible que estos efectos se deban a las neuronas locales. Lo anterior se menciona debido a que la administración de TRH incrementa la transmisión de GABA en CA1, CA3 y GrDG al inhibir canales de K^+ en reposo en las interneuronas de CA1 y CA3 (aun no hay estudios sobre el GrDG) que genera un aumento en la excitabilidad de las interneuronas de GABA pero no en las células piramidales (Deng *et al.* 2006). Dado que la inhibición de los canales de K^+ en reposo es uno de los mecanismos que modulan la excitabilidad neuronal, se ha propuesto que la generación del efecto analéptico del TRH es por lo menos en parte producido por el bloqueo de los canales de K^+ , los cuales posiblemente se encuentren en estado abierto debido a la presencia del narcótico al que el animal está sometido (Yabrough 2003). En esta forma, es posible que el TRH facilite la respuesta a entradas de impulsos excitatorios como la ACh, generando una despolarización en las neuronas colinérgicas localizadas en la parte central del MSDBB.

Dado lo anterior, se observa que no sólo las neuronas colinérgicas son responsables de mediar el efecto analéptico del TRH y que los tres principales fenotipos neuronales del complejo MSDBB presentan una alta probabilidad de coexpresar el ARNm del TRHR1 y de la PPII y por ende, de ser regulados por el TRH. Lo anterior se tendrá que comprobar este hecho especificando el fenotipo neuronal con estudios de inmunohistoquímica y revisar si estos tipos neuronales expresan los mensajeros de los

TRHRs y de la PPII. En esta forma se podrá saber como se genera el efecto analéptico mediado por el TRH en el área septal. Es de anticipar que aunque sólo un fenotipo neuronal presente estos mensajeros, no se podrá excluir la participación de los otros dos tipos debido a la complejidad de sus interconexiones.

La integración de estos tres fenotipos neuronales permite generar posibles explicaciones de fenómenos relacionados con el despertar producido por el TRH, que con el solo funcionamiento de las neuronas colinérgicas no podrían ser explicados. Anteriormente se mencionó que el TRH tiene un papel neuromodulador debido a que regula la actividad del SNC en forma estado-dependiente, provocando el despertar en animales en estado narcoléptico, mientras que en animales eutérmicos despiertos induce el sueño e hipotermia en una forma dosis dependiente (Stanton *et al.* 1981). Esto sugiere que el TRHR1 debe estar localizado en neuronas colinérgicas y glutamatérgicas, así como en neuronas GABAérgicas. Por lo tanto, proponemos que el efecto analéptico del TRH es mediado por los tres principales neurotransmisores producidos en el complejo MSDBB y no sólo por la acetil colina. En esta forma, la generación del efecto analéptico debe requerir de corrientes excitatorias (neuronas colinérgicas y glutamatérgicas) en conjunto con estímulos desinhibitorios fásicos provistos por las neuronas GABAérgicas. Adicionalmente, es posible que en un contexto narcoléptico el TRH se una preferentemente a sus receptores presentes en los somas de neuronas excitatorias, generando una red de despolarizaciones retroalimentativa que culminen en el despertar del animal, mientras que en animales eutérmicos despiertos se haga contacto preferentemente con receptores en neuronas GABAérgicas, inhibiendo dicha red induciendo el sueño.

Finalmente hay que mencionar el interesante hecho de haber encontrado agregados neuronales en la DBB, pero no en el MS con una alta concentración de ARNm de TRHR1 colocalizado con ARNm de PPII de concentración elevada. Givens y Breese (1990b) registraron neuronas localizadas principalmente en la vDBB con la capacidad de mantener disparos en una forma muy estable aún en presencia de etanol. Adicionalmente Brazhnik *et al.* (1985) describen neuronas híper estables en el mismo sitio. Por lo tanto, es tentador suponer que los grupos neuronales que observamos sean los mismos mencionados y que estos tengan un papel importante en la reversión de la narcolepsia mediada por el TRH. Sin embargo, esto sólo será comprobable identificando y registrando estos agregados bajo la influencia de un narcótico como el etanol.

8.3.2. Efecto y regulación en el septum lateral

El efecto analéptico del TRH parece estar mediada por un circuito compuesto principalmente por el MSDBB, el hipocampo y el LS. Interesantemente, nuestros estudios y los de Heuer *et al.* (2000) demuestran que todos estos sitios presentan concentraciones significativas de ARNm de TRHR1 y de PPII. Los cuerpos neuronales del hipocampo son afectados por las conexiones del MSDBB y a la vez proyectan (principalmente el cuerno de Ammon y el subiculum) al LS, siendo su principal fuente de aferentes (Risold y Swanson 1997b). Las partes rostrales del LS son inervadas principalmente por el CA1 y el subiculum, las partes caudales son principalmente inervadas por el CA3 y finalmente el núcleo septofimbrial es principalmente inervado por el CA3. Todas estas regiones envían proyecciones al MSDBB, siendo las más numerosas las provistas por parte del núcleo SFi y por las partes caudales del LS. Sin embargo, es importante mencionar que ciertas regiones del LS no inervan en forma significativa al MS (Risold y Swanson 1997b). Adicionalmente, cabe mencionar que el núcleo septohipocampal y septotriangular proyectan en forma importante al MSDBB (Risold y Swanson 1997b, Witter *et al.* 1992). De esta forma, se observa que los mensajeros de la PPII y del TRHR1 presentes en estas regiones pueden influir en la regulación del efecto analéptico en dos formas.

La primera opción es regulando al MSDBB en forma directa al activar las neuronas en que se registran y la segunda opción es regulándolo en forma indirecta, dando producto proteico de la PPII al MSDBB que regule dicho efecto. Dado que la principal población neuronal del LS es positiva a GABA (Paxinos 1995 y Colom 2006) y que la activación de las células del LS es seguida por una inhibición de los disparos generados por el MS (McLennan y Miller 1974), se genera la posibilidad de que el TRH pueda activar estas neuronas, resultando en la represión de la zona septal medial. Es importante recordar que los mensajeros registrados en estas zonas están limitados a un reducido rango de bregma, indicando que sólo ciertas eferentes del LS pudieran regular este efecto analéptico al modular la actividad del MSDBB.

La segunda opción se genera por las conexiones del LS con el hipotálamo lateral, región que alberga los cuerpos neuronales que sintetizan a las hipocretinas u orexinas, péptidos recientemente descritos capaces de regular varios procesos fisiológicos, dentro

de los cuales se encuentra el despertar (Wu *et al.* 2002). Estas neuronas envían proyecciones importantes hacia el MSDBB, produciendo efectos excitatorios en las neuronas GABAérgicas de proyección al hipocampo vía el receptor a hipocretinas tipo dos (Hcr-R2) (Wu *et al.* 2002). Estas mismas neuronas pueden ser excitadas por muscarina, sugiriendo que el proceso utilizado es similar, pero no igual al del TRH. Lo anterior se debe a que las neuronas colinérgicas septohipocampales inervan muchos tipos neuronales del hipocampo, mientras que las GABAérgicas sólo inervan interneuronas con el mismo fenotipo GABAérgico (Freud y Antal 1988).

Por otro lado, es posible que los mensajeros registrados en el LS ejerzan otros efectos distintos a la regulación del efecto analéptico del TRH. Un ejemplo destacable de lo anterior es el hecho de haber registrado la mayor concentración de ARNm de PPII en el LSV, región que recibe proyecciones importantes de TRH provenientes de la subdivisión parvocelular anterior del hipotálamo, la cual es una región que aparentemente regula aspectos de la homeostasis energética, actividades locomotoras y termogénesis, así como de la región perifornical, que regula el estado de ánimo (Wittman *et al.* 2009). Adicionalmente, el LS conecta con 4 núcleos hipotalámicos importantes de la zona periventricular y otros núcleos hipotalámicos que inervan directamente a la zona periventricular del hipotálamo (Risold y Swanson 1997b), creando la posibilidad de que el LS regule indirectamente comportamientos como la ingesta de comida y agua.

Integrando los argumentos anteriores, se sugiere que el TRH debe ejercer su efecto analéptico interactuando con el TRHR1 en la DBB y con el TRHR2 en el MS (Heuer *et al.* 2000), facilitando la despolarización de las neuronas colinérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas ahí presentes (posiblemente por el bloqueo de canales de K^+), las cuales envían sus proyecciones hacia el hipocampo, modulando su actividad y por lo tanto, posiblemente también del LS. Adicionalmente, el TRH debe poder despolarizar las neuronas GABAérgicas del LS por medio del TRHR1 generando una inhibición del MSDBB. Este proceso debe ser regulado al disminuir o aumentar la concentración de PPII en el MSDBB, lo cual debe influir en forma directa sobre la tasa de degradación del TRH. Lo anterior podrá ser comprobado con mayor facilidad, estudiando las poblaciones neuronales blanco del TRH de las zonas discretas definidas en este estudio y colocalizándolas con los mensajeros de los receptores del TRH y de la PPII. Adicionalmente, los resultados aquí presentes ayudarán a restringir el área de

microinyección de este tripéptido en el MSDBB para futuros estudios y se podrá analizar la respuesta de estas neuronas al estímulo del TRH mediante la detección de marcadores que se activen en respuesta al TRH. Finalmente, estudios con inhibidores específicos de la PPII administrados en estas regiones, demostrarán su importancia en la regulación negativa de la señalización del TRH en el septum.

9. CONCLUSIÓN

El septum es el substrato más sensible en la generación del efecto analéptico del TRH y tiene un papel fundamental en procesos tales como la memoria, el aprendizaje y la generación del ritmo θ (Dutar *et al.* 1995). Lo anterior se debe a la elevada expresión de receptores de TRH en las neuronas del complejo MSDBB, los cuales deben tener una distribución muy fina, en forma similar a sus mensajeros. El presente estudio demuestra que los mensajeros del TRHR1 y de la PPII presentan una distribución similar a lo largo del septum y que en todos los casos, aunque exista una diferencia en la intensidad de sus señales, el nivel de colocación es importante. Las regiones con una densidad importante de mensajero fueron el núcleo septohipocampal, el complejo septum medio - banda diagonal de Broca y el septum lateral. Se demostró se observó que el MSDBB muestra una concentración elevada de ARNm de TRHR1 y baja de ARNm de PPII, mientras que el LS y sus núcleos adyacentes presentan una concentración mas elevada de ARNm de PPII que de TRHR1. Se observó que sólo zonas discretas dentro del MSDBB tienen una densidad importante de ARNm de TRHR1, mientras que el LS presenta señal importante en toda su extensión. No obstante, de sus tres subdivisiones, el LSV contiene la mayor densidad de ARNm de PPII. Adicionalmente, se observó que la hDBB tiene una mayor densidad de ARNm de TRHR1 que el MSvDBB. Por parte del septum lateral. En forma especulativa, estas zonas discretas con elevada concentración de mensajero deben ser las principales encargadas de generar y regular efectos mediados por el TRH, como es el caso del efecto analéptico.

En resumen, el presente estudio demuestra en forma fina la distribución del ARNm de PPII y TRHR1 en el septum de rata e indica que ambos mensajeros tienen una distribución similar y colocan en forma importante en regiones discretas de algunos núcleos del septum. Por lo tanto, se concluye que en ambos casos, los núcleos con mayor densidad de ARNm presentan una distribución general heterogénea y diferencial debido a que el ARNm de la PPII se concentra principalmente en el LS, mientras que el ARNm del TRHR1 lo hace en el MSDBB.

10. REFERENCIAS

Alexander T. H, Handa R. J, McGivern R. F. (2002). Inhibition of prolactin secretion from the male rat anterior pituitary by cryptic sequences of prothyrotropin releasing hormone, ProTRH178-199 and ProTRH186-199. *Endocrine*. 19:313-318.

Amaral D. G., Kurz J. (1985). An analysis of the origin of the cholinergic and non cholinergic septal projections to the hippocampal formation of the rat. *J. Comp. Neurol.* 240: 37-59

Andrisani O. M. (1999). CREB-mediated transcriptional control. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene. Expr.* 9:19-32

Ashworth R., Yu R., Nelson E., Dermer S., Gershengorn M., Hinkle P. (1995). Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:512–516

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

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

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

Bidaud I., Lory P., Nicoals P., Bulant M., Ladram A. (2002). Characterization and functional expression of cDNAs encoding thyrotropin-releasing hormone receptor from *Xenopus laevis*. Identification of a novel subtype of thyrotropin-releasing hormone receptor. *Eur J Biochem.* 269: 4566 - 4576

Bowers C.Y., Friesen H.G., Hwang P., Guyda H.J., Folkers K. (1971). Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl prolinamide. *Biochem Biophys Res Commun* 45:1033–1041

Brazhnik E. S., Vingradova O. S., Karanov A. M. (1985). Frequency modulation of neuronal theta-bursts in rabbits septum by low-frequency repetitive stimulation of afferent pathways. *Neuroscience* 14: 501-508.

Breese G. R, Cott J.M., Cooper B.R. (1975). Effects of thyrotropin releasing hormone (TRH) on the actions of pentobarbital and other centrally acting drugs. *JPET* 193:11-22

Brownstein M., Palkovits M., Saavedra J., Bassiri R., Utiger R. (1974). Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science* 185:267-269

Brunello N., Cheney D. L (1981). The septal-hippocampal cholinergic pathway: Role in antagonism of pentobarbital anesthesia and regulation by various afferents. *JPET* 219:489-495

- Burgus R., Dunn T., Desidero D., Ward D., Vale W., Guillemin R. (1970). Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH releasing factor. *Nature* 226:321-325
- Calza L., Giardino L., Ceccatelli S., Zanni M., Elde R., Hökfelt T. (1992). Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor Messenger RNA in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 51:891-909
- Carr F. E., Fein H. G., Fisher C. U., Wessendorf M. W., Smallridge R. C. (1992). A cryptic peptide (160-169) of thyrotropin-releasing hormone prohormone demonstrates biological activity in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 131:2653-2658.
- Chang-Cheng Z., Cook L., Hinkle P. (2002). Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptor are modulated by agonist stimulation. *J Biol Chem*. 277:28228-28237
- Charli J. L., Mendez M., Joseph-Bravo P., Wilk S. (1987). Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9:373-378
- Charli J.L., Cruz C., Vargas M., Joseph-Bravo P. (1988) The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 13: 237-242
- Charli J.L, Méndez M., Vargas M. A., Cisneros M., Assai M., Joseph-Bravo P., Wilk S. (1989). Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 14: 191-196
- Charli J.L, Vargas M.A., Cisneros M., de Gortari P., Baeza M.A., Jasso P., Bourdais J., Perez L., Uribe R.M., Joseph-Bravo P. (1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology* 6:45-57
- Charli J.L., Pascual I., Cruz R., Vargas M. (2006). Post-secretory inactivation of peptides in the hypothalamadenohypophyseal axis. Focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin releasing hormone inactivating ectoenzyme. In *Molecular Endocrinology*. P. Joseph-Bravo (Ed), Research Signpost, Transworld Research Network, Kerala, 39-64
- Chávez-Gutiérrez L., Bourdais J., Aranda G., Vargas M.A., Matta E., Ducancel F., Segovia L., Joseph-Bravo P., Charli J.L. (2005a). A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant negative activity. *J. Neurochem.* 92: 807-817
- Cobb S., Davies C. (2005). Cholinergic modulation of hippocampal cells and circuits. *J Physiol.* 562.1:81-88
- Colom L., Castaneda M., Reyna T., Hernandez S., Garrido-Sanabria E. (2005). Characterization of medial septal glutamatergic neurons and their projection to the hippocampus. *Synapse* 58:151-164
- Colom L. (2006). Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J. Neurochem*, 96:609-623

- Cook L., Hinkle P. (2004). Fate of internalized thyrotropin-releasing hormone receptors monitored with a timer fusion protein. *Endocrinology* 145:3095-3100
- Cott J. M., Breese G. R., Cooper B. R., Barlow T. S., Prange Jr. A. J. (1976). Investigations into the mechanism of reduction of ethanol sleep by thyrotropin releasing hormone (TRH). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196: 594-604
- Cott J., Engel J. (1977). Antagonism of the analeptic activity of thyrotropin-releasing hormone (TRH) by agents which enhance GABA transmission. *Psychopharmacology* 52: 145-149
- Cruz C., Charli J. L., Vargas M. A., Joseph-Bravo P. (1991) Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J. Neurochem.* 6:1594-1601
- Cruz I. P., Nillni E.A. (1996). Intracellular sites of prothyrotropin releasing hormone processing. *J Biol Chem* 271:22736–22745
- Cui Z.J., Gorelick F.S., Dannies P.S. (1994). Calcium/calmodulin-dependent protein kinase-II activation in rat pituitary cells in the presence of thyrotropin-releasing hormone and dopamine. *Endocrinology* 134:968-978
- Cummins P.M., O'Connor B. (1998). Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochim. Biophys. Acta* 1429:1-17
- Czekay G., Bauer K. (1993). Identification of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochem. J.* 290: 921-926
- de Gortari P., Fernández-Guardiola A., Martínez A., Cisneros M., Joseph-Bravo P. (1995). Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res.* 679:144-150
- de Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérez-Martínez L., Joseph-Bravo P. (2000). Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem Int.* 37:483-496
- de Gortari P., Romero F., Cisneros M., Joseph-Bravo P. (2005). Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochem Int.* 46:347-356
- Deng P. Y., Porter J., Shin H. S., Lei S. (2006). Thyrotropin-releasing hormone increases GABA release in rat hippocampus. *J Physiol* 577.2:497-511
- Dettmar P. W., Metcalf G. (1981). Is thyrotropin releasing hormone an endogenous ergotropic substance in the brain? *Neuropharmacology.* 20:497–503
- Dudar J. D. (1975). The effect of septal nuclei stimulation on the release of acetylcholine from the rabbit hippocampus. *Brain Res.* 83: 123-133

- Dutar P., Bassant M.H., Senut M.C., Lamour Y. (1995). The septohippocampal pathway: structure and function of a central cholinergic system. *Physiol. Rev.* 75:393-427
- Elmore M. A., Griffiths E. C., O'Connor B., O'Cuinn G. (1990). Further characterization of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides* 15:31-36
- Freund T. F., Antal M. (1988) GABA-containing neurons in the septum control inhibitory interneurons in the hippocampus. *Nature* 336, 170–173.
- Frotscher M., Leranth C. (1985). Cholinergic innervation of the rat hippocampus as revealed by choline acetyltransferase immunocytochemistry: a combined light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol.* 239: 237-246
- Gary K. A., Severino K. A., Yarbrough G., Prange Jr. A., Winokur A. (2003). The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: Implications for TRH-based therapeutics. *JPET* 305:410-416
- Gayakema R. P. A., Luiten P. G. M., Nyakas C., Traber J. (1990). Cortical projection patterns of the medial septum-diagonal band complex. *J. Comp. Neurol.* 293: 103-124
- Gershengorn M.C., Osman R. (1996). Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev* 76:175–191
- Givens B. S., Breese G. R. (1990a). Site-specific enhancement of gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition of neural activity by ethanol in the rat medial septal area. *JPET.* 254: 528-538
- Givens B. S., Breese G. R. (1990b). Electrophysiological evidence that ethanol alters function of medial septal area without affecting lateral septal function. *JPET.* 253:95-103.
- Griffiths E. (1986) Thyrotropin-releasing hormone: new applications in the clinic. *Nature* 322:212–213
- Grimm-Jorgensen Y., Mc Kelvy J. F., Jackson I. M. D. (1975). Immunoreactive thyrotropin releasing factor in gastropod circumoesophageal ganglia. *Nature* 254: 620
- Gutiérrez-Mariscal M., de Gortari P., López-Rubalcava C., Martínez A., Joseph-Bravo P. (2007). Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 33:198-213
- Haisenleder, D.J., Orotlano, G.A., Dalkin, A.C., Marschall, J.C. (1992). Differential actions of TRH pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 130:2915-2923
- Harvey S., Cogburn L. A. (1996). Cryptic peptides of prepro-TRH antagonize TRH-induced GH secretion in chickens at extrapituitary sites. *J Endocrinol.* 151:359-364.

- Heuer H., Ehrchen J., Bauer K., Schäfer M. K. H. (1998). Region-specific expression of thyrotropin-releasing-hormone degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur. J. Neurosci.* 10:1465-1478
- Heuer H., Schäfer M. K. H., O'Donnell D., Walker P., Bauer K. (2000). Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J. Comp. Neurol.* 428:319–336
- Hökfelt T., Fuxe K., Johansson O., Jeffcoate S., White N. (1975). Distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in the central nervous system as revealed with immunohistochemistry. *Eur J Pharmacol.* 34:389-392
- Hollenberg A. N., Monden T., Flynn T. R., Boers M. E., Cohen O., Wondisford F. E. (1995) The human thyrotropin releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol. Endoc.* 9:540-550
- Horita A., Carino M. A., Nishimura Y. (1991). D1 agonist SKF 38393 antagonizes pentobarbital-induced narcosis and depression of hippocampal and cortical cholinergic activity in rats. *Life Sci.* 49:595-601.
- Horita A. (1998). An update of the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci.* 62: 1441-1448
- Houser C. R., Crawford G. D., Barber R. P., Salvaterra P. M., Vaughn J. E. (1983). Organization and morphological characteristics of cholinergic neurons: an immunohistochemical study with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *Brain Res.* 266: 97- 119
- Hsieh K. P., Martin T. F. (1992). Thyrotropin releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol. Endoc.* 6: 1673-1681
- Ishikawa K., Taniguchi Y., Kurosuni K., Suzuki M. (1986). Origin of septal thyrotropin-releasing hormone in the rat. *Neuroendocrinology* 44: 54-58
- Jackson I. M. D, Reichlin S. (1974). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95:854-862.
- Jones B. E., Cuello A. C. (1989). Afferents to the basal forebrain cholinergic cell area from pontomesencephalic catecholamine, serotonin and acetylcholine-neurons. *Neuroscience* 31: 37-61
- Kalivas P. W., Horita A. (1979). Thyrotropin-releasing hormone, central site of action in antagonism of pentobarbital narcosis. *Nature* 278:461-453
- Kalivas P. W., Horita A. (1980). Thyrotropin-releasing hormone: Neurogenesis of actions in the pentobarbital narcotized rat. *JPET* 212:203-210

- Kalivas P. W., Simasko S. M., Horita A. (1981). Effect of septohippocampal lesions on thyrotropin-releasing hormone antagonism of pentobarbital narcosis. *Brain Res.* 222: 253-265
- Kelly J. A. (1995). Thyrotropin-releasing hormone: basis and potential for its therapeutic use. *Essays Biochem* 30:133-149
- Kelly J. A., Slator G. R., Tipton K. F., Williams C. H., Bauer K. (2000). Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *J. Biol. Chem.* 275:16746-16751
- Kim Y. I., Dudley C. A., Moss R. L. (1987). A noradrenergic input to medial preoptic-medial septal area: an electrophysiological study. *Neuroendocrinology* 45: 77-85
- Kimura H., McGeer P. L., Peng F., McGeer E. G. (1980) Choline acetyltransferase containing neurons in rodent brain demonstrated by immunohistochemistry. *Science* 208:1057-1059
- Kiss J., Patel A. J., Baimbridge K. G., Freund T. F. (1990) Topographical localization of neurons containing parvalbumin and choline acetyltransferase in the medial septum-diagonal band region of the rat. *Neuroscience* 36:61–72
- Kiss J., Magloczky Z., Somogyi J., Freund T. F. (1997) Distribution of calretinin-containing neurons relative to other neurochemically identified cell types in the medial septum of the rat. *Neuroscience* 78: 399–410
- Köhler C., Chan-Palay V., Steinbusch H. (1982). The distribution and origin of serotonin-containing fibers in the septal area: a combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat. *J. Comp. Neurol.* 209: 91- 111
- Köhler C., Chan-Palay V., Wu J. Y. (1984). Septal neurons containing glutamic acid decarboxylase immunoreactivity project to the hippocampal region in the rat brain. *Anat. Embryol.* 169:41-44
- Kučerová J., Štrbák V. (2001). The osmotic component of ethanol and urea action is critical for their immediate stimulation of thyrotropin releasing hormone (TRH) release from rat brain septum. *Physiol. Res.* 50:309-314
- Lamour Y., Dutar P., Jobert A. (1982). Topographic organization of basal forebrain neurons projecting to the rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 34:117-122
- Lamour Y., Epelbaum J. (1988). Interactions between cholinergic and peptidergic systems in the cerebral cortex and hippocampus. *Prog. Neurobiol.* 31:109-148
- Lechan R., Wu P., Jackson I. M. D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G., Goodman R. (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science* 231:159-161
- Lechan R. M. (1993). Update on thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid Today* 16:1-11

- Lee S., Stewart K., Goodman R. (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem.* 263:16604-16609
- Leranth C., Frothscher D M. (1989). Organization of the septal region in the rat brain: cholinergic-GABAergic interconnections and the termination of hippocampo-septal fibers. *J. Comp. Neurol.* 289:304-314
- Leranth C., Deller T., Buzsaki G. (1992) Intraseptal connections redefined: lack of a lateral septum to medial septum path. *Brain Res.* 583:1-11
- Leranth C., Kiss J. (1996). A population of supramammillary area calretinin neurons terminating on medial septal area cholinergic and lateral septal area calbindin-containing cells are aspartate/glutamatergic. *J. Neurosci.* 16:7699-7710
- Ma J., Shen B., Stewart L., Herrick I., Leung L. (2002). The septohippocampal system participates in general anesthesia. *J Neurosci.* 22:1-6
- Manaker S., Winokur A., Rostene W., Rainbow T. (1985). Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 5:167-174
- Manseau F., Danik M., Williams S. (2005). A functional glutamatergic neurone network in the medial septum and diagonal band area. *J. Physiol* 566:865-884
- Mantyh P. W, Hunt S. P. (1985). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors, Localization by light microscopic autoradiography in rat brain using (³H)(3-Me-His²)TRH as the radioligand. *J. Neurosci.* 5:551-561
- Matthews D. A., Salvaterra P. M., Crawford G. D., Houser C. R., Vaughn J. E. (1987). An immunohistochemical study of choline acetyltransferase-containing neurons and axon terminals in normal and partially deafferented hippocampal formation. *Brain Res.* 402:30-43
- Mc Cown T., Moray L., Kizer J., Breese G. (1986). Interactions between TRH and ethanol in the medial septum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24:1269-1274
- McLennan H., Miller J. J. (1974). The hippocampal control of neuronal discharges in the septum of the rat. *J Physiol.* 237: 607-624
- Meibach R.C., Siegel A. (1977). Efferent connections of the septal area in the rat: an analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res.* 119:1-20
- Mellegren S. I., Srebro B. (1973). Changes in acetylcholinesterase and distribution of degenerating fibers in the hippocampal region after septal lesions in the rat. *Brain Res.* 52:19-36
- Mendez M., Cruz C., Joseph-Bravo P., Wilk S., Charli J. L. (1990). Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 17:55-62
- Milner T. A., Loy R. Amaral D. G. (1983). An anatomical study of the development of the septo-hippocampal projection in the rat. *Dev. Brain Res.* 8:343-371

- Mitsuma T., Rhue N., Kayama M., Mori V., Yokoi Y., Adachi K., Ikai R., Nakamura A, Nakayashiki A., Nogimori T., Sakai J., Hirooka Y. (1999). Distribution of thyrotropin releasing hormone receptor type 2 in rats: an immunohistochemical study. *Endocr. Regul.* 33:135-139
- Morzorati S., Kubek M. J. (1993). Septal TRH in alcohol-naïve P and NP rats and following alcohol challenge. *Brain Res Bull* 31:301-314
- Nikodémová M, Benický J, Brtko J, Štrbák V (1998). Chronic ethanol drinking and food deprivation affect rat hypothalamic-pituitary-thyroid axis and TRH in septum. *Endocrine* 9:213-218
- Nilni E., Sevarino K. (1999). The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine Rev.* 20:599-648
- Nussenzweig D., Heinfliink M., Gershengorn M. (1993). Agonist-stimulated internalization of the thyrotropin-releasing hormone receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl terminus. *J Biol Chem* 268:2389-2392
- O'Connor B., O'Cuinn G. (1985). Purification of and kinetic studies on a synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Eur. J . Biochem.* 150:47-52.
- O'Dowd B., Lee D., Huang W., Nguyen T., Cheng R., Liu Y., Wang B., Gershengorn M., George S. (2000). TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol. Endocrinol.* 14:183-93.
- O'Leary R., O'Connor B. (1995). Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem.* 65:953-963.
- Oderfeld-Nowak B., Narkiewicz O., Bialowas J., Dabrowska J., Wierasko A., Gradkowska M. (1974). The influence of septal nuclei lesions on activity of acetylcholinesterase and choline acetyltransferase in the hippocampus of the rat. *Acta Neurobiol. Exp.* 34:583-601
- Ohmichi M., Sawada T., Kanda Y., Koike K., Hirota K., Miyake A., Saitel A. R. (1994). Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269:3783-3788
- Onteniente B., Geffard M., Campistron G., Calas A. (1987) An ultrastructural study of GABA-immunoreactive neurons and terminals in the septum of the rat. *J. Neurosci.* 7:48-54.
- Onteniente B., Tago H., Kimura H., Maeda T. (1986). Distribution of γ -aminobutyric acid. Immunoreactive neurons in the septal region of the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 248:422-430

- Palacios J. M. (1991). Ultrastructural study of cholinergic neurons in the medial septal nucleus and vertical limb of the diagonal band of Broca in the basal forebrain of the rat. *J. Chem. Neuroanat.* 4:205-221
- Paxinos G. (1995). *The rat nervous system*. Second edition. Academic Press. San Diego, USA. pp:405-493
- Paxinos G., Watson C. (2005). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Fifth edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press.
- Pazos A., Cortes R., Palacios J. M. (1985). Thyrotropin-releasing hormone receptor binding sites: autoradiographic distribution in the rat and guinea pig brain. *J Neurochem.* 45:1448-1463
- Peterson G. M. (1989). A quantitative analysis of the crossed septohippocampal projection in the rat brain. *Anat. Embryol.* 180:421-425
- Ponce G., Charli J-L., Pasten J.A., Aceves C., Joseph-Bravo P. (1988). Tissue-specific regulation of pyroglutamate amino-peptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 48:211-218
- Prigge S. T., Mains R. E., Eipper B. A., Amzel L. M. (2000). New insights into copper monooxygenases and peptide amidation: structure, mechanisms and function. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:1236-1259
- Risold P. Y, Swanson L. W (1997a). Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res. Rev.* 24:91-113
- Risold P. Y, Swanson L. W (1997b). Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res. Rev.* 24:115-195
- Rommelspacher H., Kuhar M. J. (1974). Effects of electrical stimulation on acetylcholine levels in central cholinergic nerve terminals. *Brain Res.* 81:243-251
- Sánchez E., Vargas M. A., Singru P. S., Pascual I., Romero F., Fekete C., Charli J. L., Lechan R. M. (2009). Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology.* 150:2283-2291
- Santori E., Schmidt D. (1980). Effects of MK-771, a TRH analog, on pentobarbital-induced alterations of cholinergic parameters in discrete regions of rat brain. *Reg. Peptides.* 1:69-74
- Santori E., Schmidt D., Kalivas P., Horita A. (1981). Failure of muscarinic blockade to antagonize analepsis induced by thyrotropin-releasing hormone and MK-771 in the rat. *Psychopharmacology* 74:13-16
- Schally A., Redding T., Bowers C., Barret J. (1969). Isolation and properties of porcine thyrotropine-releasing hormone. *J Biol Chem* 244:4077-4088

- Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle J., Bauer K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9334-9338
- Schomburg L., Turwitt S., Prescher G., Lohmann D., Horsthemke B., and Bauer K. (1999). Human TRH-degrading ectoenzyme cDNA cloning, functional expression, genomic structure and chromosomal assignment. *Eur. J. Biochem.* 265:415-422
- Schmitmeier, S., Thole, H., Bader, A., and Bauer, K. (2002). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur. J. Biochem.* 269:1278-1286
- Sharif N., Burt D. (1985). Visualization and identification of TRH receptors in rodent brain by autoradiography and radioreceptor assays: focus on amygdala, N. accumbens, septum and cortex. *Neurochem Int.* 7:525-532
- Simasko S., Horita A. (1984). Localization of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors in the septal nucleus of the rat brain. *Brain Res.* 296:393-395
- Staiger J. F., Nurnberger F. (1991). The efferent connections of the lateral septal nucleus in the guinea pig: intrinsic connectivity of the septum and projections to other telencephalic areas. *Cell Tissue Res.* 264:415-426
- Stanton T. L., Beckman A. L., Winokur A. (1981). Thyrotropin-releasing hormone effects in the central nervous system: Dependence on arousal state. *Science* 214:678-681
- Stevenin B., Lee S. L. (1995). Hormonal regulation of thyrotropin releasing hormone (TRH) gene. *Endocrinologist* 5:286-296
- Storm-Mathisen J. (1972). Glutamate decarboxylase in the rat hippocampal region after lesion of the afferent fiber system. Evidence that the enzyme is localized in intrinsic neurons. *Brain Res.* 40:215-235
- Sun Y., Lu X., Gershengorn M. C. (2003). G protein coupled receptor signalling in neuroendocrine systems. Thyrotropin-releasing hormone receptors – similarities and differences. *J. Mol. Endoc.* 30:87-97
- Swanson L. W., Cowan W. M. (1977). An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J. Comp. Neurol.* 172:49-84.
- Swanson L. W., Cowan W. M. (1979). The connections of the septal region in the rat. *J. Comp. Neurol.* 186:621-655.
- Takahara J., Arimura A., Schally A.V. (1974). Stimulation of prolactin and growth hormone release by TRH infused into a hypophysial portal vessel. *Proc Soc Exp Biol Med* 146:831-835
- Tamura Y., Shintani M., Nakamura A., Monden M., Shiomi H. (2005). Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Res.* 1045:88-96

- Taylor W., Dixon J. (1978). Characterization of a pyroglutamate aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.* 253:6934-6940
- Toth K., Freund T. F. (1992). Calbindin D28K-containing nonpyramidal cells in the rat hippocampus: their immunoreactivity for GABA and projection to the medial septum. *Neuroscience* 49:793-805
- Toth K., Borghely Z., Freund T. F. (1993). Postsynaptic targets of GABAergic hippocampal neurons in the medial septum-diagonal band of Broca complex. *J. Neurosci.* 13:3712-3724
- Vargas M. A., Joseph-Bravo P., Charli J. L. (1994). Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology* 60:323-330
- Vertes R. P. (1992) PHA-L analysis of projections from the supramammillary nucleus in the rat. *J. Comp. Neurol.* 326:595-622
- Vertes R. P., Crane A. M., Colom L. V., Bland B. H. (1995). Ascending projections of the posterior nucleus of the hypothalamus: PHA-L analysis in the rat. *J. Comp. Neurol.* 359:90-116
- Wilber J.F., Utiger R.D. (1968). *In vitro* studies on mechanism of action of thyrotropin releasing factor. *Proc Soc Exp Biol Med* 127:488-490
- Wilk S., Wilk E. (1989). Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: Purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochem. Int.* 15:81-89
- Witter M., Daelmans H., Jorritsma-Byham B., Staiger J., Wouterlood F. (1992). Restricted origin and distribution of projections from the lateral to the medial septal complex in rat and guinea pig. *Neurosci Lett.* 148:164-168
- Wittmann G., Füzesi T., Singru P., Liposits Z., Lechan R., Fekete C. (2009). Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior parvocellular subdivisions of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Comp. Neurol.* 515:313-330.
- Wolf N. J., Butcher L. L. (1986). Cholinergic systems in the rat brain. III. Projections from the pontomesencephalic tegmentum to the thalamus, tectum, basal ganglia and basal forebrain. *Brain Res. Bull.* 16:603-637
- Wu M., Zhang Z., Leranath C., Xu C., van den pol AN, Alerja M. (2002). Hypocretin increases impulse flow in the septohippocampal GABAergic pathway: implications for arousal via a mechanism of hippocampal disinhibition. *J Neurosci.* 22:7754-7765
- Yabrough G. (2003). Fundamental molecular mechanism of the CNS effects of TRH. *Trends. Pharmacol. Sci.* 24:617-618
- Yanagisawa T., Prasad C., Peterkofsky A. (1980). The subcellular and organ distribution and natural form of histidyl-proline diketopiperazine in rat brain determined by a specific radioimmunoassay. *J. Biol. Chem.* 255:10290-10294

Zabavnik J., Arbuthnott G., Eidne K. A. (1993). Distribution of thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain. *Neuroscience* 53:877-887

Zaborszky L., Cullinan W. E. (1989). Hypothalamic axons terminate on forebrain cholinergic neurons: an ultrastructural doublelabeling study using PHA-L tracing and ChAT immunocytochemistry. *Brain. Res.* 479:177-184