



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Respuesta diferencial de la vía TRHérgica talámica al
estrés agudo o crónico**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

FERNANDO CÁZAREZ MÁRQUEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DOCTORA MARIANA GUTIÉRREZ MARISCAL**

2012



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.

<p>1. Datos del alumno</p> <p>Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Univesidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Carrera Número de cuenta</p>	<p>1. Datos del alumno</p> <p>Cázarez Márquez Fernando 01 (797) 9754545 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 407049046</p>
<p>2. Datos del tutor</p> <p>Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>2. Datos del tutor</p> <p>Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal</p>
<p>3. Datos del sinodal 1</p> <p>Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. Gertrudis Hortensia González Gómez</p>
<p>4. Datos del sinodal 2</p> <p>Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. Rosa María Uribe Villegas</p>
<p>5. Datos del sinodal 3</p> <p>Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra. Edith Sánchez Jaramillo</p>
<p>6. Datos del sinodal 4</p> <p>Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno</p>	<p>Dra María del Carmen Miñana Solís</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito</p> <p>Título Número de páginas Año</p>	<p>7. Datos del trabajo escrito</p> <p>Respuesta diferencial de la vía TRHérgica talámica al estrés agudo o crónico. 64 2012</p>

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mi familia, a mis padres, hermanos, abuelos, tíos, primos; sin ustedes jamás habría logrado esta tesis que ahora presento.

Un agradecimiento especial para la Dra. Patricia Joseph Bravo y al Dr. Jean Louis Charli quienes me aceptaron en su laboratorio para realizar esta tesis de licenciatura y que además me apoyaron indiscutiblemente en todo momento.

Muchísimas gracias a la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal por guiarme a cada momento, por permitirme aprender junto a ti técnicas bastante complicadas. Gracias por soportar muchos de mis defectos y por tenerme la paciencia para enseñarme, corregirme y ayudarme en cada una de las actividades académicas. Además más allá de ser mi tutora, gracias por escucharme y ser mi amiga.

Un agradecimiento especial a la Dra. Edith Sánchez Jaramillo pues nos brindó su apoyo incondicional durante la elaboración de esta tesis y sobre todo que nos permitió aprender de sus técnicas. Nunca importó la hora, ni el cansancio, ni varios tropiezos, siempre estuvo ahí para orientarnos y para apoyarnos. Los resultados y la técnica de esta tesis, la hibridación *in situ* son producto de su trabajo y completa vigilancia.

Gracias a todo el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular sé que cuento con ustedes como compañeros y amigos al igual que ustedes cuentan conmigo: Gabriela Chávez, Yamili Vargas, Israim Sotelo, Adrián Pérez, Gabriela Gómez, Iván Lazcano, Pilar Torres Iván Patiño, Carmen Espinoza y al cubano Jorge González. También agradezco a las Dras. Lorraine Jaimes, Antonienta Cote e Isel Pascual, y a la Dra. Rosa María Uribe quién también aportó durante cada parte metodológica de la elaboración de esta tesis y funge como mi sinodal. Gracias a la Elena Martell Lugo por su apoyo logístico en el laboratorio y por esos gestos de bondad y sincera amistad.

Agradezco al QFB. Miguel Cisneros, a la Química Fidelia Romero y a Manuel Villa por ayudarme y enseñarme a realizar las técnicas de Radioinmunoensayos, RT-PCR y la parte molecular de la hibridación *in situ*, y brindarnos todo el apoyo con el material del laboratorio, respectivamente. Agradezco a Miguel Ángel Olvera por el apoyo administrativo, ya que gracias a él pudimos tener a tiempo las órdenes de compra y los materiales necesarios.

Muchas gracias para todos mis profesores de la carrera. Gracias Dra. Hortensia Gertrudis González y Dra. Maricarmen Miñana por ser aceptar ser parte de los sinodales en el comité evaluador de esta tesis, gracias por brindarme su tiempo y espacio para las revisiones y correcciones.

Agradezco a Shirley Ainsworth encargada de la unidad de biblioteca, por su apoyo en la obtención de artículos de difícil acceso. Al personal del bioterio: Elizabeth Mata, Marcela Ramírez, Sergio González y Rubén Blancas por brindarnos los animales y las mejores condiciones para todos los procedimientos. A la unidad de computo por brindarnos todo su apoyo técnico: Alma Lidia Martínez Valle, Arturo Ocadiz, Ing. Roberto Rodríguez Bahena.

Gracias a cada uno de mis amigos: Miriam, Ileana, Ornella, María, Maira, Mamá Jose, David, José Raúl, Ernesto, Izchel, Mara, Nadia, Roberto, al Dr. Ruud Buijs, Cristian, Montse, Comadre, Alexander, Danae, Carlos, Edgar, Adri, Chava, Jaciel, Espe, Elihú.

A ti Lalo porque siempre estuviste conmigo a pesar de las peleas, problemas, muchas gracias por estar conmigo.

Gracias a todos por formar parte de mi formación como estudiante y cómo persona... Muchas gracias.

INDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	6
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. ANTECEDENTES	23
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. OBJETIVOS	27
5. HIPÓTESIS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7. RESULTADOS	43
8. DISCUSIÓN	51
9. CONCLUSIONES	56
10. REFERENCIAS	57

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Participación del cerebro en el mantenimiento de la homeostasis y en las respuestas conductuales y fisiológicas a estresores.	11
Figura 2. Participación del sistema límbico en la respuesta conductual al estrés	15
Figura 3. Aferencias y eferencias del núcleo paraventricular del tálamo	17
Figura 4. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT).	19
Figura 5. Elementos de la comunicación TRHérgica y cascada de señalización TRHérgica intracelular	10
Figura 6. Distribución de los ARNm de elementos de señalización TRHérgica en el cerebro de la rata en condiciones basales.	25
Figura 7. Restrictor de movimiento.	28
Figura 8. Curvas semilogarítmicas estándar para los radioinmunoensayos de Corticosterona y TSH	31
Figura 9. Obtención y organización de los cortes.	33
Figura 10. Plásmido pcADN3 que contiene el gen del TRH-R2 de rata.	35
Figura 11. Regiones del núcleo paraventricular del tálamo (PVT) cuantificadas.	42
Figura 12. Peso y ganancia de peso bajo restricción crónica.	44
Figura 13. Actividad de los ejes Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA) y HPT por estrés crónico y agudo.	45
Figura 14. Pruebas de revelado para la hibridación <i>in situ</i> (ISH) para el ARNm del TRH-R2.	46
Figura 15. Distribución del ARNm del TRH-R2 en estado basal en el cerebro de la rata.	47
Figura 16. Cuantificación del ARNm del TRH-R2 en el PVT bajo estrés crónico y agudo.	50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación cualitativa de los niveles de ARNm del TRH-R2, TRH-R1, TRH y PPII, en el tálamo de la rata en condiciones basales.	25
Tabla 2. Mezcla de transcripción <i>in vitro</i> .	35
Tabla 3. Mezcla de hibridación (paso 1).	38
Tabla 4. Mezcla de hibridación (paso 2).	38
Tabla 5. Distribución y análisis cualitativo del ARNm del TRH-R2 en el cerebro de la rata.	48

ABREVIATURAS

Para la nomenclatura de los núcleos y estructuras cerebrales, se mantuvieron las siglas en inglés usadas en el atlas del cerebro de la rata (Paxinos y Watson, 2004) para facilitar la comparación entre la literatura y esta tesis.

³⁵ S-UTP: uracil trifosfato marcado con azufre 35	CORT: corticosterona
ACTH: corticotropina	cpm: cuentas por minuto
AD: tálamo anterodorsal	Cpu: caudado putamen
ADN: ácido desoxirribonucleico	CREB: elemento de unión responsivo a AMPc
AH: hipotálamo anterior	CRH: hormona liberadora de corticotropina
AM: tálamo anterior medio	CRH-R1: receptor tipo 1 de CRH
ANOVA: análisis de varianza	DAG: diacil glicerol
APT: pretectal anterior	DEPC: Dietil pirocarbonato
ARC: núcleo arcuato	DLG: geniculado dorsolateral
ARNm: ácido ribonucleico mensajero	DMH: núcleo dorsomedial del hipotálamo
AV: tálamo anterior ventral	DpG: capa gris profunda del colículo superior
AVDL: dorsolateral del anteroventral talámico	DpWh: capa blanca profunda del colículo superior
AVDM:dorsomedial del anteroventral talámico	EC: estímulo condicionado
AVP: arginina-vasopresina	EI: estímulo incondicionado
BIC: braquium inferior del colículo	EIK-1: factor de transcripción relacionado a E-26
BNST: núcleo del lecho de la estría terminal	EM: eminencia media
CBG: globulina de unión a glucocorticoides, o transcortina	g: gramos
CeA: amígdala central.	GCs: glucocorticoides
CG: gris central	GP: globo pálido

GREs: elementos de respuesta a glucocorticoides	MRS: receptores a mineralocorticoides
GRs: receptores a glucocorticoides	MS: septum medio
HBD: banda diagonal de broca parte horizontal	NAcc: núcleo accumbens
HPA: eje hipotálamo-pituitaria-adrenal	NE: norepinefrina
HPT: eje hipotálamo-pituitaria-tiroides	NTS: núcleo del tracto solitario.
HT: hormonas tiroideas	PAM: monooxigenasa alfa amidante de peptidilglicina
IMO: inmovilización	Par: corteza Parietal
InG: capa gris profunda del colículo superior	PC1/3: convertasa 1/3
InsP ₃ : inositol trifosfato	PC2: convertasa 2
InWh: capa blanca intermedia del colículo superior	Pe: núcleo periventricular
KDa: Kilodaltones	PEG: polietilenglicol
LC: locus coeruleus	PFC: corteza prefrontal
LA: amígdala lateral	PKC: proteína-kinasa C
LDTg: núcleo laterodorsal tegmental	PPII: piroglutamil peptidasa II
LH: hipotálamo lateral	PPTg: núcleo tegmental pedunculo pontino
LSD: septum lateral dorsal	PVA: núcleo paraventricular del tálamo anterior
LSI: septum lateral intermedio	PVN: núcleo paraventricular del hipotálamo
LSV: septum lateral ventral	PVP: núcleo paraventricular del tálamo posterior
MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno	TSH: tirotropina
MD: núcleo mediodorsal del tálamo	VDB: banda diagonal de broca parte horizontal
mPO: area preóptica media	VMH: núcleo ventromedial del hipotálamo

RESUMEN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido que fue inicialmente caracterizado por su función hipofisiotrópica a partir de la cual recibió su nombre. Desde su caracterización, estudios farmacológicos, anatómicos y conductuales han sugerido que el TRH está involucrado en el procesamiento de las emociones. El tálamo es una región sensorial y límbica, muchos de sus núcleos expresan el ARNm del proTRH, de la enzima responsable de su inactivación (piroglutamil péptidasa II, PPII) y/o de sus dos tipos de receptores descritos a la fecha (TRH-R1 y TRH-R2). El modelo de restricción de movimiento que es un modelo de estrés psicológico, ha mostrado que la expresión de los elementos de la comunicación TRHérgica (niveles de ARNm de proTRH, TRH-R1, TRH-R2 y PPII) es regulable en esta condición en el tálamo completo. En esta tesis se muestra un análisis detallado de la distribución anatómica basal del ARNm del TRH-R2 en los núcleos talámicos de la rata así como su respuesta a estrés por restricción del movimiento mediante el uso de la técnica de hibridación *in situ*.

Se sometieron a ratas macho adultas de la cepa Wistar a restricción de movimiento de forma aguda (RAg, una sola exposición) ó crónica (RCr, 14 exposiciones consecutivas en 14 días) y se sacrificaron a los animales 45 min después del último episodio. Se obtuvo sangre troncal y los cerebros fueron extraídos y congelados inmediatamente. El peso de los animales se monitoreó a lo largo de todo el experimento. De los cerebros, se obtuvieron rebanadas horizontales de 18 μm de grosor abarcando desde el inicio del núcleo reuniens (bregma -7.6 mm aproximadamente) hasta el final del núcleo paraventricular talámico (bregma -5.10 mm aproximadamente); las láminas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Los animales RCr tuvieron una ganancia de peso menor comparada con la de los animales no estresados demostrando que el protocolo de estrés crónico se relaciona con la inhibición de la ingesta alimenticia. Los niveles de corticosterona fueron más altos en el grupo RAg que en los controles (CI) mientras que los del grupo RCr no fueron diferentes de su control, sugiriendo que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal mostró habituación al estrés crónico.

Por medio de hibridación *in situ* con sonda marcada radioactivamente complementaria al ARNm del TRH-R2, se analizó la distribución basal en varios núcleos del cerebro y los posibles cambios por el estrés de la restricción del movimiento en el núcleo paraventricular talámico (PVT) en su parte anterior (PVA) y en su parte posterior (PVP). Al cuantificar el ARNm del TRH-R2 en el PVT, encontramos un aumento en la señal positiva para TRH-R2 en el PVA tanto en los animales sometidos a restricción aguda como en los sometidos a estrés crónico; el PVP solo mostró aumento por la restricción crónica sugiriendo que la vía TRHérgica de esta región, está involucrada diferencialmente en las respuestas al estrés agudo y crónico.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio del cerebro, de los circuitos neurales y de la actividad neuronal es de gran relevancia para entender los cambios tanto estructurales como químicos en respuesta a situaciones que pudieran ser amenazantes (McEwen, 2008; McEwen y Gianaros 2011). El cerebro regula las respuestas fisiológicas, conductuales, cognitivas y emocionales que se desarrollan para contener contra los cambios que ocurren a nuestro alrededor. El Sistema Nervioso Central (SNC) se adapta o no, como resultado de hacer frente a experiencias estresantes (Figura 1). Entender estos mecanismos contribuirá a diagnosticar y tratar de manera más eficiente enfermedades psiquiátricas como el estrés post-traumático, la ansiedad, la depresión, entre otras, ó crónicas como la diabetes y obesidad que van en dramático aumento en las sociedades occidentales.

1.1. Definición de estrés

Desde principios del siglo XIX, Claude de Bernard (Francia, 1813-1878) introdujo la teoría de que un organismo comienza a ser más independiente de su entorno cuando desarrolla formas más complejas de estabilizar su ambiente interno, contraponiéndose a los cambios en el ambiente externo. En 1937 Walter Canon (Estados Unidos, 1871-1945) llamó a esta idea “homeostasis” (Johnson *et al.*, 1992).

En los años 30, Hans Selye introdujo el término estrés en el ámbito de la fisiología humana. Este concepto ha ido cambiando conforme se ha avanzado en el conocimiento de las estructuras neuroanatómicas y funcionales que procesan los cambios en la conducta, fisiología y bioquímica que mantienen la homeostasis (Chrousos *et al.*, 1988).

En esta tesis definiré al estrés, basándome en los trabajos de Chrousos y Gold (1992), como un estado de amenaza a la homeóstasis, donde las fuerzas que irrumpen son llamadas estresores y las fuerzas o procesos que se contraponen, respuestas adaptativas.

Los estresores se pueden clasificar como físicos o emocionales (psicológicos). Los físicos incluyen cambios en el ambiente interno como la anoxia, la hipoglicemia, el ayuno. Éstos son reconocidos por vías cerebro-visceral (autónomas), o por vías sensoriales que directamente activan centros de respuesta al estrés en el SNC (Engelmann *et al.*, 2004). En contraposición, los estresores psicológicos causan una respuesta en ausencia de un reto fisiológico inmediato y su procesamiento involucra, como mencionaré más adelante, a regiones especializadas del SNC como amígdala, hipocampo y corteza pre-frontal, entre otras (Herman *et al.*, 2003).

Los estresores también pueden clasificarse por la intensidad de la respuesta al estrés y la duración del estímulo (agudo y crónico).

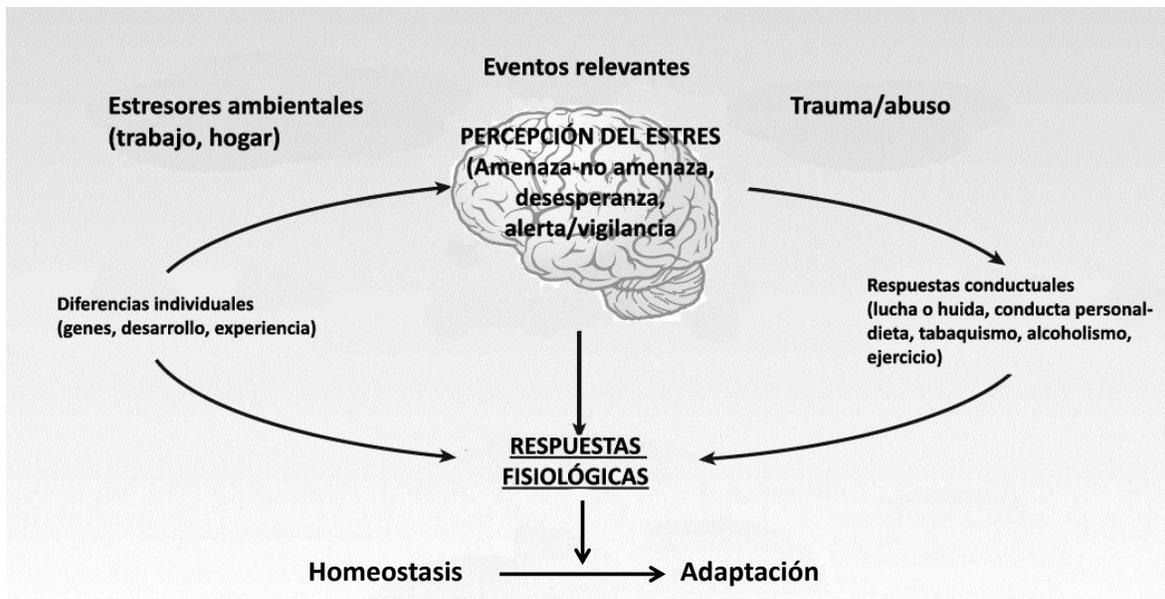


Figura 1. Participación central del cerebro en el mantenimiento de la homeostasis y en las respuestas conductuales y fisiológicas a estresores. Modificado de McEwen *et al.* (2008)

1.2. Respuesta al estrés

La respuesta al estrés es mediada por vías autonómicas, endócrinas y conductuales, que coordinadamente neutralizan los efectos del estresor. Para un mejor entendimiento temporal y bioquímico de la respuesta al estrés debe tomarse en cuenta que los estresores pueden actuar simultáneamente (Johnson *et al.*, 1992).

La principal rama simpática del Sistema Nervioso Autónomo (SNA) involucrada en la respuesta al estrés es la del locus coeruleus (núcleo localizado en el tallo cerebral) que libera norepinefrina (NE). Este sistema al activarse libera NE a una gran cantidad de regiones cerebrales (corteza prefrontal, núcleo accumbens, amígdala, hipocampo, núcleo paraventricular del hipotálamo, entre otras), provocando el aumento en el estado de alerta-vigilancia (alerta-vigilia) y las conductas de ansiedad (Chrousos y Gold, 1992). Este sistema participa en la respuesta de “pelea o huida” de un organismo y se activa de forma inmediata.

Por otro lado, la respuesta endócrina al estrés es regulada por la hormona liberadora de corticotropina (CRH), producida por el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), que aumenta su síntesis y liberación ante el estrés y provoca finalmente un aumento en los niveles de glucocorticoides circulantes (cortisol en humano y corticosterona en roedores).

Conductualmente la respuesta a estrés implica estrategias de huida o pelea o de defensa; se observan aumentos en las frecuencias cardíaca y respiratoria, aumento en la tasa de defecación, etc., que son producto del aumento en la actividad del SNA y del endócrino.

A continuación se describen en mayor detalle la respuesta endócrina y emocional al estrés.

1.2.1. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA).

El componente endócrino de la respuesta al estrés es conocido como el eje HPA cuya actividad es regida por el PVN el cual integra numerosos estímulos provenientes de distintas regiones del cerebro (Zigmond *et al.*, 1999). El PVN sintetiza, entre otras moléculas, CRH (hormona liberadora de corticotropina) considerada la molécula más importante en la respuesta neuroendócrina y conductual al estrés (Coste *et al.*, 2001). Durante la respuesta aguda a un estresor, las neuronas parvocelulares que producen CRH aumentan su síntesis; estas neuronas proyectan hacia la eminencia media (EM), región donde se libera el péptido maduro a la circulación portahipofisaria en respuesta a un estresor. La pituitaria anterior sintetiza y libera corticotropina (ACTH) en respuesta a CRH. La Arginina-Vasopresina (AVP) producida en el PVN también participa en estimular la liberación de ACTH por parte de la adenohipófisis. La ACTH viaja por el torrente sanguíneo y actúa en la corteza adrenal estimulando la liberación de glucocorticoides (GCs) (de Kloet *et al.*, 2005).

Tanto el estrés psicológico como el físico, producen activación del eje HPA, lo que resulta en la elevación de los niveles de GCs en la circulación sanguínea periférica (Engelmann *et al.*, 2004).

Los GCs participan tanto en el control de la homeostasis como en la respuesta al estrés. En situación basal se secretan GCs de manera ultradiana y circádiana, es decir, los niveles fluctúan cada una y cada 24 horas, respectivamente (Lightman, 2008.) Aproximadamente el 95% de los GCs circulantes se encuentran unidos a una alfa globulina llamada “transcortina” o “globulina de unión a corticosteroides” (CBG). Los GCs unidos a la CBG son fisiológicamente inactivos. La fracción libre de GCs representa la fracción activa de la hormona la cual ejerce efecto de retroalimentación negativa sobre la liberación del CRH en el SNC y de ACTH en la pituitaria (Johnson *et al.*, 1992).

Los GCs pueden ejercer efectos fisiológicos a través de receptores citoplasmáticos. Una vez que el GC se encuentra unido al receptor, este último se trasloca al núcleo. En el núcleo al interactuar como homodímero se une directamente a secuencias de ADN conocidas como elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs) (Pratt, 1990), regulando la actividad transcripcional de genes blanco. Los GCs promueven el catabolismo de glucógeno, músculo y grasas, movilizand así la energía requerida para la respuesta al estrés. (Munck *et al.*, 1984)

En el cerebro, los GCs actúan a través de dos tipos de receptores:

- Receptores a mineralocorticoides (MRs). Están principalmente en órganos circumventriculares y estructuras del sistema límbico como hipocampo y el septum lateral (Johnson., et al., 1992). En los dos últimos se modula la respuesta a estímulos emocionales y ambientales, provocando cambios en la conducta y en la actividad del eje HPA al estrés. Los MRs están involucrados además en la regulación de los ritmos diarios de ingesta y vigilia.
- Receptores a glucocorticoides (GRs). Se encuentran presentes en altas concentraciones en el hipotálamo, particularmente en las neuronas de CRH. También se encuentran en el hipocampo, el septum lateral, la amígdala y el núcleo del tracto solitario (NTS). En estas regiones se involucra a los GRs con las respuestas conductuales, neuroendócrinas y autonómicas al estrés.

Los GRs tienen diez veces menor afinidad por los glucocorticoides que los MRs; por esta razón, cuando los niveles de glucocorticoides en plasma son elevados, como en situaciones de estrés, la unión de glucocorticoides a GRs también aumenta. Cuando las concentraciones de la corticosterona son basales, la mayoría de los MRs están ocupados, lo que significa que la corticosterona activa a los GRs además de los MRs en altas concentraciones inducidas por estrés (Prager y Johnson, 2009).

Una importante característica de los estresores en la vida diaria es que tienen una naturaleza persistente. Bajo estas circunstancias, la elevación crónica de los GCs cambia los mecanismos de respuesta al estrés y puede ocurrir el fenómeno de habituación, que se explica más adelante. La elevación crónica de GCs puede además, causar el desarrollo de patologías incluyendo desordenes inmunes, neurodegeneración y depresión (Girotti *et al.*, 2006).

1.2.2. El Sistema límbico en el estrés

El sustrato anatómico de las emociones ha sido tema de discusión desde el siglo XIX. Gracias al trabajo fundamentalmente neuroanatómico de Paul Broca (Francia, 1824-1880) se propone que las emociones se originan en el cerebro, en particular en un área llamada “lóbulo límbico”. En 1878, Paul Broca describió que varias áreas corticales forman un anillo alrededor del tallo cerebral. Usando el vocablo latino para borde “*limbus*”, llamó a este conjunto de regiones cerebrales lóbulo límbico que en sus inicios estaba formado por la corteza cingulada, la corteza del lóbulo temporal y el hipocampo. En 1927, Walter Cannon (Estados Unidos, 1871-1945) incluyó al tálamo como un componente esencial en el procesamiento de las emociones. En su trabajo sostiene que las emociones son producidas cuando las señales llegan al tálamo directamente desde los receptores sensoriales o por vías corticales y que la emoción es determinada por el grado de activación del tálamo (Bear *et al.*, 2001). Diez años después, James Papez (Estados Unidos, 1883-1958) mostró que el lóbulo límbico unía la corteza con el hipotálamo por lo que incluyó a éste último y a la amígdala dentro del sistema límbico, refrendó además la inclusión del tálamo dentro del sistema al cual se le conoció posteriormente como circuito de Papez. En 1939, Heinrich Kluver (Alemania,

1897- Estados Unidos, 1979) y Paul Bucy (Estados Unidos, 1904-1992) demostraron la importancia del lóbulo temporal en el procesamiento de las emociones (Fuchs y Flügge, 2003). En 1952 el término de sistema límbico se popularizó por Paul MacLean (Bear et al., 2001).

No hay hasta la fecha, un criterio aceptado para decidir qué áreas o estructuras forman parte del sistema límbico (LeDoux, 2003). Aun así se mantiene el término no tanto como un concepto anatómicamente estricto, sino como una agrupación de regiones que responden a un estímulo con componente emocional (Ledoux, 2000). Entre los años 70's y 80's se popularizó el uso del miedo condicionado Pavloviano como prueba conductual para estudiar el procesamiento de las emociones. Desde entonces, se reconoce ampliamente que la amígdala es el centro maestro de las respuestas al miedo, reemplazando así al hipotálamo y al hipocampo (Fuchs y Flügge., 2003).

Regiones del sistema límbico como la corteza prefrontal, el septum, la amígdala y el hipocampo regulan la actividad del eje HPA (Zigmond *et al.*, 1999). En su mayoría, la comunicación desde estas regiones no es directa hasta el PVN, por lo que se sugiere que la comunicación entre el componente límbico y el endócrino durante la respuesta al estrés, ocurre principalmente a través de una estructura conocida como BNST (núcleo del lecho de la estría terminal). Además se conoce que áreas talámicas que reciben aferencias desde el tracto espino-talámico proyectan hacia la amígdala lateral (LA). Áreas corticales que procesan estímulos somatosensoriales, incluyendo los nociceptivos, proyectan también a la LA y algunos otros núcleos de la amígdala (Figura 2) (LeDoux, 2000).

Estudios de resonancia magnética funcional en humanos muestran que hay una relación entre la actividad del tálamo y la amígdala durante el miedo condicionado (Buchel *et al.*, 1998; LaBar *et al.*, 1998). Las correlaciones directas son entre la actividad de la amígdala, tálamo y el colículo, lo que enfatiza la importancia de las vías tálamo-amigdalinas en el cerebro humano (Morris *et al.*, 1998; 1999).

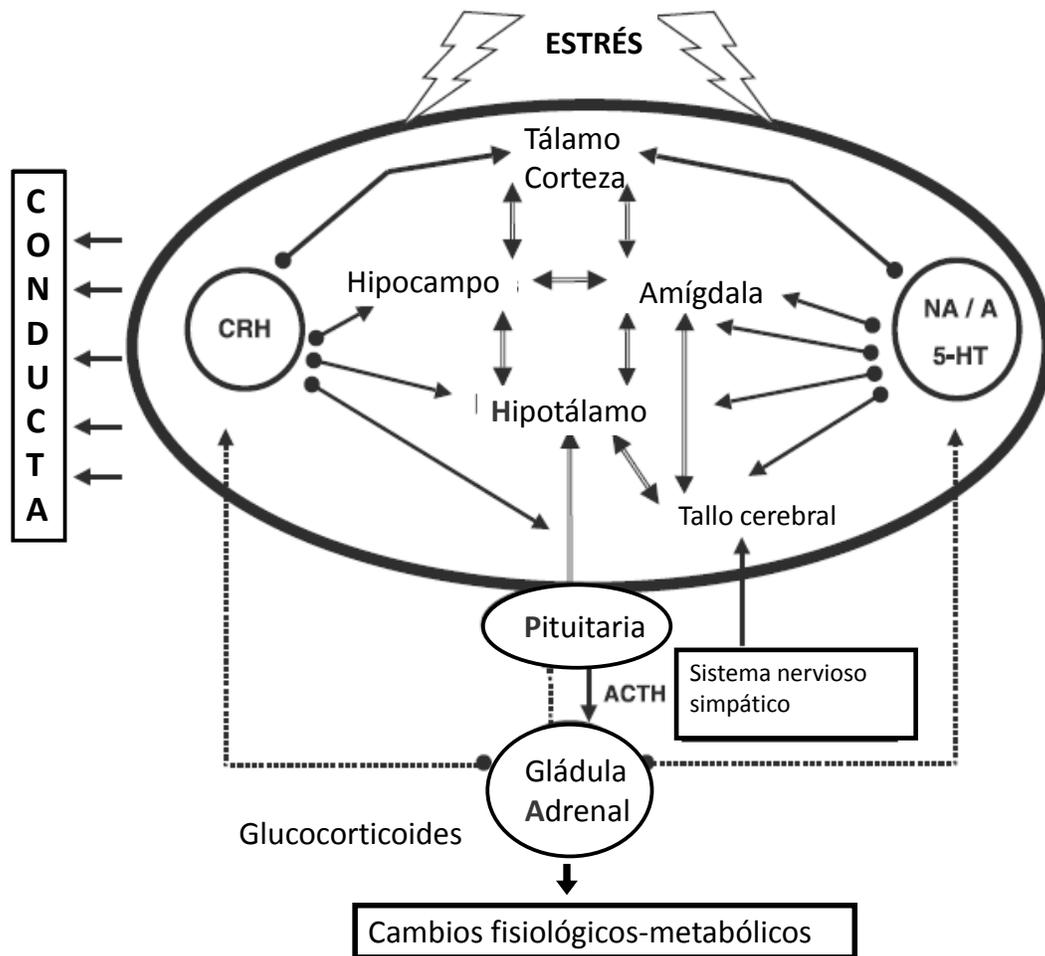


Figura 2. Esquematación de la participación del sistema límbico en la respuesta conductual al estrés. Modificado de Fuchs y Függen (2003).

1.3. Habitación al estrés.

A los cambios que ocurren por una exposición repetida a un mismo estrés se les llama habitación y se define como la respuesta conductual disminuida, resultante de una repetida estimulación que no está relacionada con adaptación o fatiga sensoriales (Thompson y Spencer, 1966). Las respuestas conductuales de la habitación pueden incluir la disminución de la actividad de ciertas funciones del sistema nervioso como respuestas pupilares, transpiración y contracciones musculares. Una de las respuestas fisiológicas de la habitación se observa en la liberación hormonal, que es la actividad final de los sistemas neuroendócrinos ante el estrés (Rankin *et al.*, 2009). La exposición a un estresor de forma repetida disminuye la respuesta del eje HPA, protegiendo al organismo de un potencial daño por efecto del hipercorticosteroidismo (Armario *et al.*, 2004).

1.4. El núcleo paraventricular del tálamo (PVT).

El PVT es miembro del grupo de núcleos de la línea media e intralaminar, que intervienen en procesos de alerta y atención, entre otras funciones (Bentivoglio *et al.*, 1991). Por su relevancia en las respuestas a estrés y sobre todo, por su participación en los procesos de habituación, a continuación se describen de manera general las aferencias y eferencias de este núcleo así como las funciones principales que se le han atribuido.

Aferencias. El PVT recibe gran variedad de información desde el hipotálamo, incluyendo proyecciones del núcleo supraquiasmático (SCN), arcuato (ARC), dorsomedial (DMH), ventromedial (VMH) y anterior (AH), así como del hipotálamo lateral (LH) y área preóptica media (mPO) (Revisado en: Li y Kirouac, 2008). También recibe información desde el núcleo periventricular (Pe) y el PVN (Paxinos, 1995). El núcleo mediodorsal del tálamo (MD) proyecta hacia el PVT (Saper, 1982). El PVT así como el resto de núcleos intralaminares y de la línea media del tálamo, reciben proyecciones de núcleos asociados con el estado de alerta, incluyendo el mesencéfalo reticular profundo (MdD), el núcleo laterodorsal tegmental (LDTg), el núcleo tegmental peduncular pontino (PPTg), el rafé medio y rafé dorsal, y el locus coeruleus (LC) (Paxinos, 1995).

Recientemente se demostró que la región ventromedial del núcleo reticular talámico (Rt) proyecta tanto al PVA como al PVP (Li y Kirouac, 2012). La parte más anterior de esta región proyecta predominantemente al PVA y la posterior al PVP. El PVP recibe también aferencias desde las cortezas infralímbica, peduncular profunda (Dp) e insular (IC). La capa 6 de la corteza prelímbica proyecta tanto al PVA como al PVP siendo la parte más anterior la que proyecta en mayor cantidad al PVP.

Eferencias. El PVT envía proyecciones al núcleo accumbens (NAcc), amígdala, corteza prefrontal (PFC) media, subiculum ventral en el hipocampo y BNST, que son regiones del cerebro asociadas con la recompensa, motivación, mecanismos emocionales y respuesta autonómica asociada al estrés (Revisado en Li y Kirouac, 2008) (Figura 3).

Las funciones en las que se involucra al PVT aún no se conocen del todo. En ratas con lesiones del PVT hay aumento de peso (Bhatnagar y Dallman, 1999) y atenuación del incremento tanto de la actividad locomotora como de los niveles de corticosterona en plasma, que normalmente se observan en la anticipación de alimento (Nakahara *et al.*, 2004). El PVT se activa por el estrés (Bhatnagar y Dallman, 1998), incluyendo paradigmas como la restricción, la prueba de campo abierto, exposición al vapor de éter, descargas eléctricas en las patas e inyección de LPS (revisado en Fernandes *et al.*, 2002)

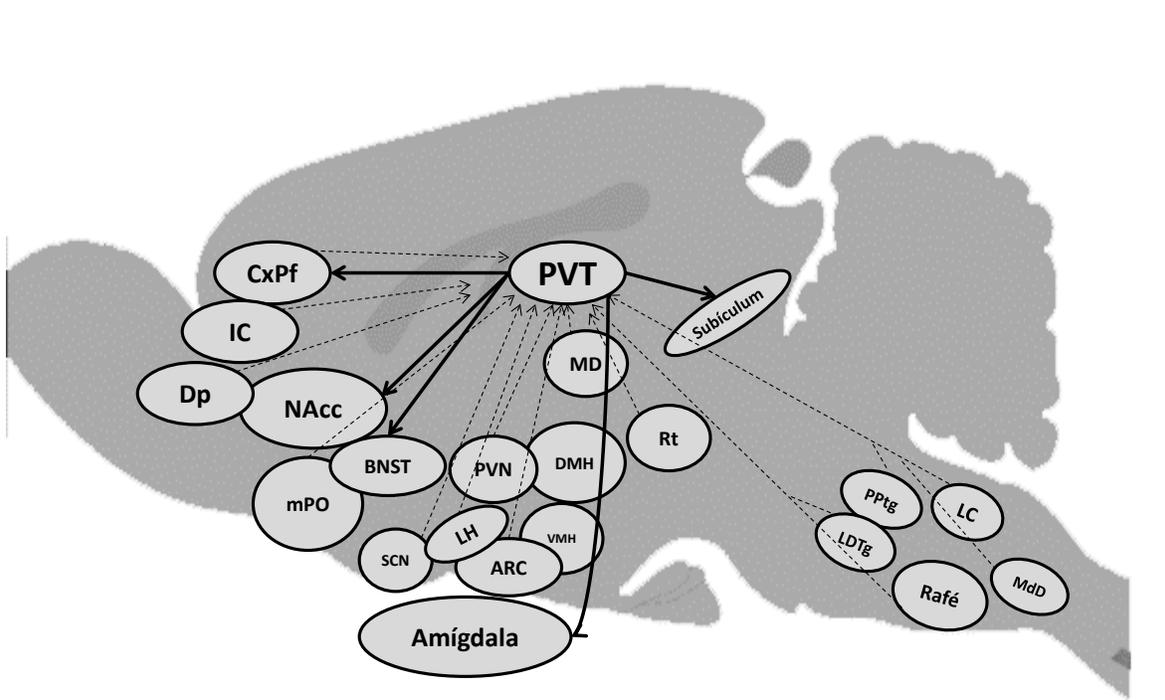


Figura 3. Esquema de las principales aferencias (flechas punteadas) y eferencias (líneas continuas) del núcleo paraventricular del tálamo.

1.5. La restricción de movimiento como estresor psicológico.

Existen diversas metodologías para estudiar el estrés de tipo psicológico en modelos animales.

El modelo de restricción de movimiento es un procedimiento experimental desarrollado para realizar estudios biomédicos relacionados con el estrés psicológico o psicosomático. El término hace referencia a que el procedimiento, no involucra daño físico o dolor para el animal. Sin embargo, se desencadena una respuesta al estrés como producto de la angustia que el animal experimenta al ser incapaz de moverse libremente, debido a que permanece en una superficie con espacio limitado, durante un tiempo definido (Golub *et al.*, 2004).

Se han desarrollado varios tipos de modelos de restricción del movimiento que van de muy a medianamente severas. Las primeras se llevan a cabo sujetando las extremidades de la rata a una tabla de madera (IMO), mientras que algunas menos severas limitan el movimiento de los animales en contenedores de acrílico (RES).

En el método de Ginsberg y Lombardo (2003 y 2001), que es uno de los mejores caracterizados, las ratas se colocan en tubos de acrílico transparentes, quedando completamente restringido su movimiento. Los animales pueden mover sus extremidades y la cabeza, pero no pueden caminar en ningún sentido, tampoco girar. Es uno de los modelos mejor aceptado para estudiar el estrés

psicológico, ya que somete al animal a un reto metabólico mínimo (Girotti *et al.*, 2006) al evitar la respuesta activa del organismo (como huida ante un evento adverso) (McIntyre *et al.*, 1999); es utilizado sobre todo para evaluar los efectos psicológicos del estrés en las emociones, conductas de ansiedad o en el aprendizaje y la memoria.

Animales sujetos a RES de forma aguda presentan un pico máximo en los niveles de corticosterona y de de ACTH en suero, y del ARNm de GRs (tanto en hipotálamo como en e hipocampo) a los 30 minutos después de iniciar el estímulo. Dos horas después, los niveles de todos los marcadores anteriores regresan a sus niveles basales (Noguchi *et al.*, 2010). El ARNm de CRH y de su receptor CRH-R1 muestran la misma respuesta en el PVN parvocelular. La expresión del ARNm de c-fos, un marcador de actividad neuronal, se ve incrementada después de 30 minutos de estrés por RES en neuronas parvocelulares del PVN, mientras que el aumento en la expresión de su proteína (Fos), ocurre 2 horas después tanto en el PVN como en distintos núcleos del hipotálamo . La intensidad de la expresión de Fos en las regiones límbicas (amígdala, corteza frontal e hipocampo), varía dependiendo de la duración, la severidad de la restricción y la región estudiada (Imaki *et al.*, 2001).

1.6 Hormona liberadora de tirotropina

La *hormona liberadora de tirotropina (TRH)* fue la primera hormona hipofisiotrófica caracterizada químicamente (Boler *et al.*, 1969; Burgus *et al.*, 1969). TRH es un tripéptido (pGlu-His-proNH₂) con funciones neuroendócrinas y que además se expresa ampliamente en el sistema nervioso central (Figura 4).

La primera función descrita para TRH fue el control del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT), responsable de la síntesis y liberación de TSH y de las hormonas tiroideas. La activación del HPT inicia en las neuronas hipofisiotróficas de TRH del PVN que proyectan sus terminales axónicas a la EM donde están en proximidad con los capilares del sistema porta-hipofisiario. Cuando el TRH se libera en estos capilares, (Revisado en Lechan y Fekete 2006), se estimula la biosíntesis y secreción de tirotropina (TSH) en la pituitaria, que a su vez estimula la síntesis de hormonas tiroideas, tiroxina (T4) y triiodotironina (T3) en la glándula tiroides. La T3 es la forma activa de la hormona al tener mayor afinidad a los receptores de hormonas tiroideas (TRs). La T4 es convertida a T3 por la actividad de desyodasas localizadas dentro de la mayoría de los tejidos blanco como en la grasa parda, el hígado, los riñones etc. Las hormonas tiroideas ejercen un efecto negativo en la pituitaria y el hipotálamo, inhibiendo la liberación de TSH y la síntesis y liberación del TRH respectivamente (Dyess *et al.*, 1988).

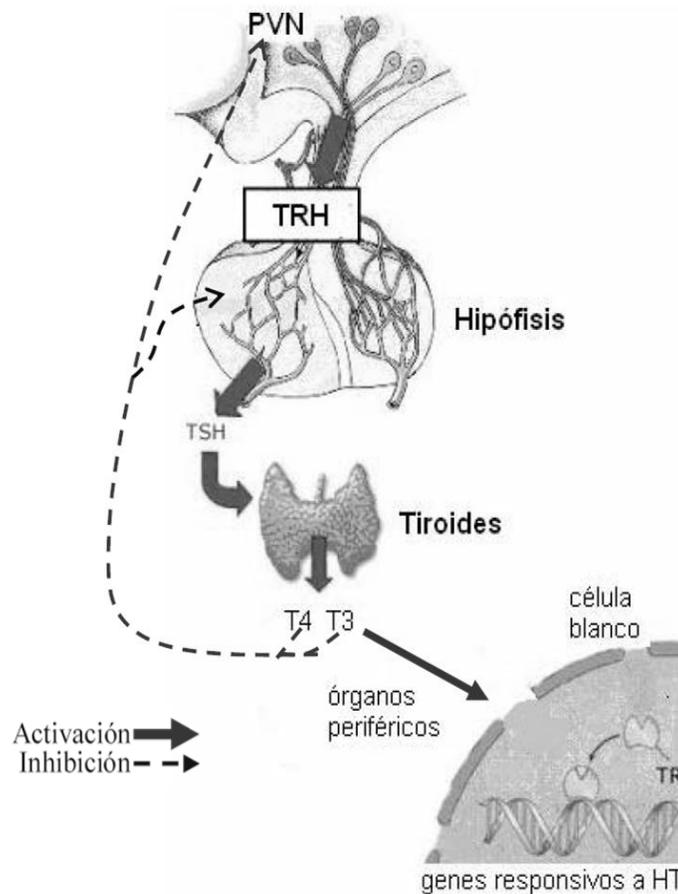


Figura 4. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides. El TRH sintetizado en la subdivisión pavocelular del PVN y liberado de la EM al sistema hiposifiario, estimula la secreción de TSH de la hipófisis, que a su vez estimula la secreción de T4 y T3 de la tiroides. En el torrente sanguíneo las HTs actúan sobre sus órganos blanco donde regulan la expresión de varios genes; y por retroalimentación negativa (líneas punteadas) la actividad del eje HPT. Modificado de García Vázquez (2006)

1.6.1. Biosíntesis del TRH.

El gen de TRH, tanto en humanos como en roedores, codifica para múltiples copias de TRH. Después de su transcripción y traducción, la molécula precursora (proTRH, 26 Kilodaltones [Kda]) es secuencialmente procesada por las convertasas 1/3 y 2 (PC1/3 y PC2 respectivamente) en residuos de aminoácidos básicos, para generar una variedad de segmentos que incluyen precursores de TRH (Schaner *et al.*, 1997). Estos precursores son modificados por las carboxipeptidasas, que remueve los residuos básicos que flanquean al precursor inmediato de TRH, el Gln-His-Pro. Finalmente, el Gln-His-Pro es ciclizado en el N-terminal por acción de la enzima glutaminil ciclasa, y amidado en el C-terminal por acción de la enzima monooxigenasa alfa amidante de peptidilglicina (PAM) (Perello y Nillni, 2007). Al llegar a la terminal axónica, son liberadas las moléculas activas de TRH (pGlu-His-Pro-NH₂).

1.6.2. Receptores y degradación del TRH.

La vía de señalización del TRH incluye, además del tripéptido, dos receptores hasta ahora descritos y varias enzimas de inactivación de entre las cuales una muestra alta especificidad por TRH. En 1990 se descubrió el receptor tipo 1 (TRH-R1) (Straub *et al.*, 1990). El receptor tipo 2 (TRH-R2) fue descubierto por dos grupos simultáneamente en rata (Cao *et al.*, 1998; Itadani *et al.*, 1998) pero a la fecha no ha sido descrito en humanos. Los receptores para TRH están acoplados a proteínas G que activan la vía de la proteína-cinasa C (PKC) y la vía de MAP Cinasa, lo que induce la modulación de la transcripción génica vía factores de transcripción (CREB, AP-1 y Elk-1) (Figura 4B) (Sun *et al.*, 2003).

La Piroglutamil peptidasa II (PPII) es una zinc-metaloexopeptidasa que específicamente hidroliza el enlace piroglutamil-histidil del TRH (O'Connor y O'Cuinn, 1984) (Figura 5C). La PPII se encuentra unida a la membrana con su sitio activo hacia el espacio extracelular, lo que permite el reconocimiento del sustrato en las sinapsis y en los sitios de acción del TRH. Está ampliamente distribuida en el cerebro y en tejidos periféricos como la pituitaria (Charli *et al.*, 1988, Heuer *et al.*, 1998) donde también hay una alta presencia del TRH-R1.

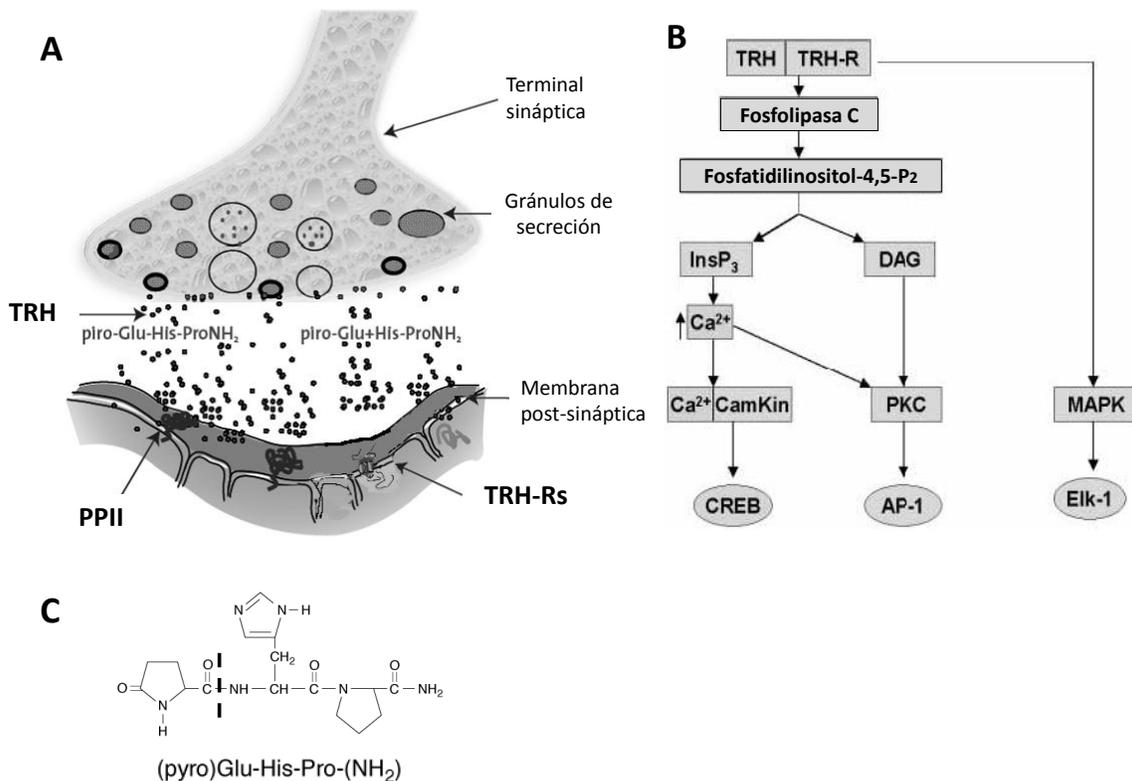


Figura 5. A) Elementos de la comunicación TRHérgica, Modificado de Charli y Joseph-Bravo (2008), **B)** Cascada de señalización TRHérgica intracelular (Sun *et al.*, 2003). **C)** Estructura del TRH. En línea punteada se muestra el sitio de catálisis de la PPII.

1.6.3. Similitudes y diferencias de los dos receptores a TRH.

Los dos receptores de TRH se encuentran distribuidos diferencialmente en el cerebro y el tejido periférico, la comparación por alineamiento de secuencia de aminoácidos indica que los receptores al TRH muestran 50% de identidad. El TRH-R2 sin embargo, exhibe mayor actividad basal y es internalizado más rápidamente que el TRH-R1 pero ambos poseen afinidad indistinguible por el TRH y la señalización de ambos tipos de receptores sigue la misma vía. En ausencia de ligandos, la activación de AP-1, Elk-1 y CREB es más alta en células transfectadas (HEK) que expresan TRH-R2 que las que expresan TRH-R1, indicando que el TRH-R2 tiene una señalización basal independiente del TRH (Wang y Gershengorn 1999, Sun y Gershengorn 2002).

La internalización del TRH-R2 inducida por el TRH es más rápida que la del TRH-R1 (O'Dowd et al., 2000, Sun y Gershengorn 2002) además que hay importantes diferencias en la estructura 3D del TRH-R1 y TRH-R2 que cambian las propiedades de señalización (Sun y Gershengorn, 2002). No se ha determinado si la disminución a largo plazo del TRH-R2 es mediada por regulación negativa del número de receptores como resultado de disminución en la transcripción del gen o en la estabilidad del ARNm, como se sabe ocurre para el TRH-R1 (Fujimoto *et al.*, 1992). El TRH-R2 está ampliamente distribuido en el cerebro en comparación al TRH-R1, lo que sugiere un papel importante del TRH-R2 en el cerebro.

1.6.4. El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) en el estrés.

Las hormonas tiroideas (HT) son importantes reguladoras del gasto energético: al ser liberadas al torrente sanguíneo se unen a receptores (TR) localizados en células periféricas y centrales, regulando así la transcripción de múltiples genes blanco, induciendo la síntesis de enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos y proteínas, estimulando la lipólisis y termogénesis (Yen, 2001). Al igual que el eje HPA, la actividad del eje HPT es regulada por retroalimentación negativa. Cuando los niveles de las HT incrementan, actúan sobre sus receptores localizados en el PVN o en la hipófisis, inhibiendo la síntesis y liberación de TRH o la síntesis y secreción de TSH respectivamente, lo que lleva al reestablecimiento de los niveles basales de T4 y T3 (Akil *et al.*, 1999).

Aunque el eje HPT no suele asociarse con los principales sistemas que se activan en la respuesta al estrés psicológico, se ha descrito que responde a ciertas condiciones fisiológicas estresantes donde hay incremento en los niveles de corticosterona sérica como la exposición al frío (Arancibia *et al.*, 1983) y la succión (Uribe *et al.*, 1993, Sánchez et al., 2001). Tanto en humanos como en modelos animales se observa un efecto inhibitorio de los glucocorticoides sobre la actividad del eje HPT *in vivo* (Armario *et al.*, 1984; 1993). El estrés agudo por inmovilización (IMO) durante dos horas inhibe la actividad del eje: incrementa el contenido de TRH en la EM, disminuye los niveles de ARNm de pro-TRH en el PVN y los niveles séricos de TSH y de T4 (Cizza *et al.*, 1996). La restricción de movimiento aguda por 30 min tiene los mismos efectos inhibitorios sobre la

actividad del eje HPT si la medición se hace 15 min post-RE, a excepción de los niveles de T4 sérica que no cambian (Rebolledo-Solleiro, 2005). En contraste, modelos de estrés psicológico como la exposición al ruido (Armario *et al.*, 1984), el nado en el laberinto de agua de Morris (Aguilar-Valles *et al.*, 2005) o la exposición a la prueba de enterramiento defensivo (Gutiérrez Mariscal *et al.*, 2008) causan cierto grado de activación del eje HPT que se evidencia por un rápido incremento de hormonas tiroideas, tirotropina o de los niveles del ARNm del TRH en el PVN.

1.6.5 Funciones no endócrinas del TRH.

Además de la función hipofisiotrófica del TRH inicialmente descrita, tanto el TRH, sus receptores y la PPII se encuentran ampliamente distribuidos en regiones del SNC, donde pueden participar en el procesamiento de funciones no endócrinas. La participación del TRH extrahipotalámico ha sido inferida a partir de estudios farmacológicos usando TRH o algunos análogos sintéticos los cuales producen un amplio rango de efectos. Entre éstos se encuentran el incremento del estado de alerta y la locomoción, el mejoramiento del aprendizaje y la memoria, así como sus efectos analéptico, antidepresivo, antiepiléptico, ansiolítico y sus efectos neuroprotectores (revisado en Lechan y Fekete, 2006). Específicamente se sabe que hay activación de las neuronas TRHérgicas en el hipocampo en ratas sometidas al laberinto de agua de Morris (Aguilar-Valles *et al.*, 2007), inhibición de las vías TRHérgicas en la amígdala y relación inversamente proporcional con la conducta de ansiedad en la prueba de enterramiento defensivo (DBT) y el laberinto de cruz elevado (Gutiérrez-Mariscal *et al.*, 2008).

2. ANTECEDENTES

2.1. El núcleo paraventricular posterior del tálamo y la habituación al estrés.

Varios núcleos talámicos están relacionados en la habituación al estrés y la regulación del eje HPA (Bhatnagar *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2002; Jaferi *et al.*, 2003; Girotti *et al.*, 2006; Jaferi y Bhatnagar, 2006; Day *et al.*, 2009). El PVT es parte del tálamo límbico, y está conectado a la amígdala y la corteza prefrontal, siendo importantes estas conexiones en la transmisión de información emocional. Bhatnagar y Dallman (1998) encontraron que en animales expuestos a estrés por frío durante 8 días y retados posteriormente a estrés por RES durante 30 min, hay una facilitación de la respuesta del eje HPA, ya que mostraron mayor actividad del eje comparado con los animales que solo fueron retados al RES sin la exposición crónica al frío. En estas condiciones, se describió que hay aumento en la inmunoreactividad para c-fos en varios núcleos entre ellos el paraventricular talámico posterior (PVP). Al lesionarse el PVP hubo un incremento de la actividad del eje HPA; aumentando la respuesta del ACTH ante un estrés por RES de animales expuestos a estrés crónico por frío comparados con los controles no lesionados, que también mostraron el aumento de la respuesta del ACTH por el proceso de facilitación. Con este trabajo sugirieron que el PVP es inhibitorio de la actividad del eje HPA pero sólo en animales que han experimentado estrés previo (Bhatnagar y Dallman, 1998). El PVP recibe información desde la corteza prefrontal infralímbica y proyecta hacia el BNST y a la amígdala central, dos sitios que regulan la información emocional y la actividad del eje HPA (Li y Kirouac, 2012). Bhatnagar *et al.*, (2002) examinaron por primera vez el papel del PVP en la habituación de la respuesta del eje HPA a la restricción crónica del movimiento. Plantearon la hipótesis de que el PVP inhibe la actividad del eje HPA bajo condiciones de estrés crónico causando habituación. Al lesionarse el PVP con ácido ibetónico, no hubo diferencia en los niveles de ACTH entre animales con RES por 30 minutos de forma aguda o de forma crónica, es decir, bajo restricción crónica y con lesión del PVP, no hubo habituación. Los animales sham (controles de cirugía) bajo restricción crónica mostraron niveles más bajos de ACTH (habituados) comparados con los de única exposición. Esto demostró que el PVP está relacionado en la habituación al estrés.

Para averiguar si los glucocorticoides inhiben el eje HPA por acción en el PVT se han hecho estudios farmacológicos en animales estresados crónicamente. En animales con lesión del PVP, sometidos a RES de forma crónica inyectados con dexametasona (análogo de corticosterona) vía subcutánea 2 horas antes de ser sometidos al último RES, no se observó la disminución de los niveles de CORT en comparación con animales sham (Jaferi *et al.*, 1993).

El PVT contiene tanto GRs como MRs (Ahima *et al.*, 1991; Morimoto *et al.*, 1996) y es a través de la actividad de estos receptores que se inhibe la actividad del eje HPA. Se demostró mediante la inyección diaria directa de antagonistas de GR y MR en el PVP, en animales que fueron restringidos crónicamente, que la corticosterona liberada durante el estrés crónico, inhibe la respuesta del eje HPA (Jaferi y Bhatnagar, 2006).

2.2. La restricción de movimiento aguda y crónica.

Restricción Aguda

Resultados del laboratorio (Rebolledo-Solleiro, 2005) mostraron en animales sometidos a 30 min de RES aguda, un pico máximo en los niveles de corticosterona a los 15' que disminuyó a los 45' aunque aún son mayores respecto a animales intactos. Los niveles de ARNm de CRH en el PVN disminuyeron en los animales sacrificados a los 15' y aumentan 45% a los 45' post Restricción. El ARNm de CRH aumentó a los 15 y a los 45' post restricción. El ARNm del receptor a glucocorticoides (GR) aumentó a los 45'.

En cuanto al eje HPT, los niveles séricos de tirotropina (TSH) bajaron un 57% en los animales sacrificados a los 15' y se recuperaron en los sacrificados a los 45' comparados con animales control. La cantidad de TRH en el hipotálamo medio basal aumentó a los 45' post restricción sugiriendo una inhibición de la liberación al torrente portal-hipofisiario.

Restricción Crónica

La exposición repetida a la restricción de movimiento causó una ganancia menor de peso y un menor consumo de alimento (5.74 %) después de 14 días. En estos animales, los niveles de corticosterona no cambiaron con respecto a los controles en los animales sometidos a restricción crónica por 14 días y sacrificados 45' después (RCr45') del último periodo de RES. En el PVN el ARNm de CRH-R1 aumentaron en los animales sacrificados 24 horas post restricción crónica (RCr24h). Los niveles de ARNm de GR bajaron en los RCr45' y en los RCr24h. En los RCr45', la TSH mostró tendencia a aumentar y el contenido de TRH en la eminencia media disminuye. Las hormonas tiroideas no mostraron cambios. Se puede decir que a tiempos cortos como en la restricción aguda, hay una relación entre la actividad de los ejes HPA y HPT. En los animales sacrificados 15' después suben los niveles de CORT y bajan los niveles de TSH los que nos sugiere que la activación de un eje podría inhibir la del otro. Por otro lado en la restricción crónica ya no se observó la activación del eje HPA, además de que el contenido de TRH de la EM se modificó, lo que sugirió que la relación entre los ejes podría modificarse a tiempos más largos.

2.3. Expresión basal de los elementos que componen la vía TRHérgica en el tálamo.

El tálamo expresa el ARNm de todos los elementos de la comunicación TRHérgica (Heuer *et al.*, 2000). El núcleo reticular es el único que expresa el ARNm de TRH dentro del tálamo. En cambio los receptores para el TRH se encuentran expresados casi de forma mutuamente excluyente en los núcleos talámicos: el TRH-R1 sólo se reporta en el PVT, mientras que el TRH-R2 se expresa en una gran cantidad de núcleos talámicos (*e.g.* anterodorsal, paraventricular talámico, reuniens) (Tabla 1). La PPII también se expresa en varios núcleos talámicos pero con menor intensidad que el TRH-R2 o el TRH en estado basal (Figura 6). La figura 6 muestra la distribución talámica de los elementos de la comunicación TRHérgica mientras que en la tabla 1 se muestra de forma resumida la evaluación cualitativa de la anatomía por núcleos de los mismos elementos.

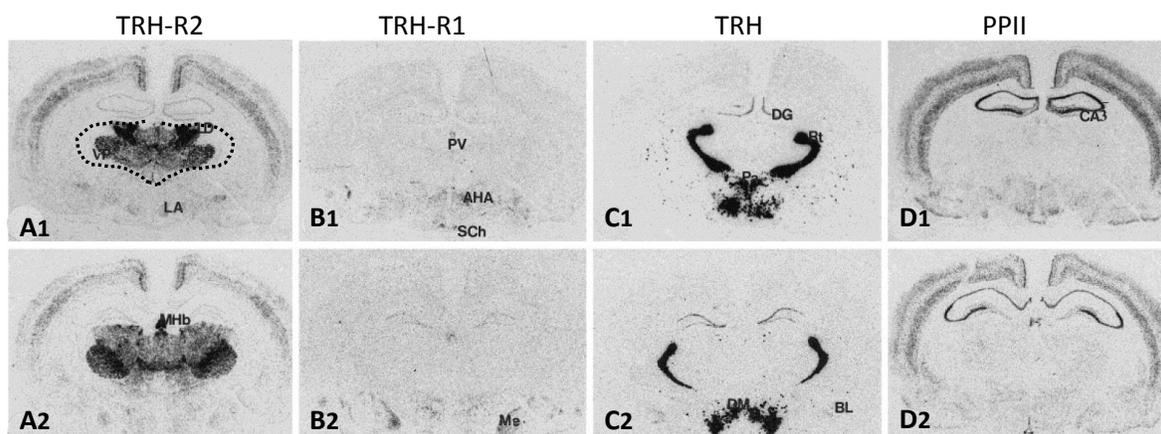


Figura 6. ARNm de elementos de señalización TRHérgica en el tálamo de la rata en condiciones basales. Autoradiogramas de cortes coronales de 20 μm de grueso. Rebanadas consecutivas hibridadas con sondas de ^{35}S -RNA para TRH-R2 (**A1-A2**), TRH-R1 (**B1-B2**), TRH (**C1-C2**) y PPII (**D1-D2**). La localización de los distintos núcleos del tálamo señalados en los esquemas A1-D2 se delimita con una línea punteada en A1. Figura modificada de Heuer et al., (2000).

Tabla 1. Evaluación cualitativa de los niveles de ARNm del TRH-R2, TRH-R1, TRH y de la PPII en el tálamo de la rata en condiciones basales

Núcleo	TRH-R2	TRH-R1	TRH	PPII
Ventral posterior	+++++	-	-	++
Centromedial	+++++	-	-	+
Anterodorsal	+++++	-	-	++
Anteroventral	+++++	-	-	+
Reticular	-	-	+++++	-
Paraventricular talámico	+++++	+++++	-	-
Xifoideo	++++	-	-	++

+++++ densidad máxima, ++++ muy denso; +++ denso, ++ moderado; + bajo, - debajo del límite de detección; * neuronas dispersas. Tabla modificada de Heuer et al., (2000).

2.4. Cambios en los elementos de la vía TRHérgica talámica en diferentes condiciones experimentales.

El análisis del ARNm del TRH-R2 por hibridación *in situ de* animales bajo kindling amigdalino (estímulo subconvulsivo que se propaga desde el sitio de estimulación hacia otras regiones), muestra un aumento en el núcleo ventromedial talámico ($225\pm 25\%$) y en el reuniens ($235\pm 58\%$) (De Gortari *et al.*, 2005) lo que sugiere que hay una participación de la comunicación TRHérgica en la vía talamo-amigdalina.

Animales sometidos a RES crónico y sacrificados después de 45 o 24h después del último periodo de RES, mostraron disminución en el contenido de TRH y en los niveles relativos de ARNm de TRH a tiempos cortos (45 minutos) en el tálamo total. Además, los niveles relativos de ARNm del TRH-R1 aumentaron en los mismos grupos que mostraron disminución en el contenido de tripéptido maduro; los del TRH-R2 disminuyeron a tiempos cortos mientras que los de la PPII lo hacen pero 24h después del último periodo de RES. En conjunto, estos resultados indican que las vías talámicas TRHérgicas se modulan en el estrés de tipo crónico, aunque no se puede definir si es de forma inhibitoria o excitatoria, ni específicamente en que núcleos se dan los cambios (García-Vázquez, 2006).

Otros protocolos experimentales de nuestro laboratorio también han mostrado cambios en la cantidad de TRH (péptido maduro) en el tálamo. Ante el laberinto de cruz elevado (un paradigma conductual que mide ansiedad y locomoción) los animales presentan un aumento del contenido de TRH en el tálamo mientras que si los animales son sometidos a la prueba de campo abierto, el contenido de TRH baja. Además, en la prueba de campo abierto durante el periodo de oscuridad se ha encontrado una correlación negativa entre la cantidad de péptido tanto con la locomoción como con la ansiedad por lo que se infirió que a mayor locomoción y ansiedad hay mayor liberación TRH.

3. JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que los diferentes elementos de la vía TRHérgica (TRH, TRH-R1 y/o R2, y PPII) se modulan en respuesta al estrés crónico y agudo por RES en varias regiones del sistema límbico, entre ellas, en el tálamo. Sin embargo no se ha definido con precisión en qué núcleos específicos del tálamo es donde se regula la actividad TRHérgica debido a que las técnicas de análisis utilizadas a la fecha no lo han permitido (radioinmunoensayo y RT-PCR de región completa). Utilizar la técnica de hibridación *in situ* para estudiar posibles cambios de la vía TRHérgica en el tálamo de animales sometidos a RES aguda y crónica, nos permitirá cuantificar los cambios en los niveles de ARNm de los receptores a TRH, de la PPII y de TRH en núcleos y subnúcleos específicos del tálamo.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL. Determinar si existen diferencias en la respuesta de las vías TRHérgicas talámicas al estrés agudo o crónico.

En esta tesis nos enfocamos sólo en uno de los elementos de la vía TRHérgica, el TRH-R2, de donde se desglosan los siguientes objetivos particulares:

- Describir la distribución del ARNm del TRH-R2 en el tálamo de la rata en condiciones basales usando la técnica de hibridación *in situ*.
- Determinar si existe diferencia en la expresión del ARNm del TRH-R2 en condiciones de estrés agudo y crónico en el núcleo paraventricular del tálamo en el cerebro de la rata.

5. HIPÓTESIS

Si la señalización TRHérgica talámica está involucrada en la respuesta al estrés agudo y/o crónico, entonces cambiará la expresión de sus elementos.

-> Sí el TRH-R2 del núcleo paraventricular del tálamo está relacionado con la respuesta al estrés, entonces cambiará su expresión bajo condiciones de estrés crónico o agudo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Animales y modelo de estrés.

Se usaron 21 ratas albinas macho adultas (*Rattus norvegicus*) de la cepa Wistar de 371.20 ± 48.14 g (promedio \pm e.s.m) y 3.5 meses de edad. Las ratas fueron criadas en el bioterio del Instituto de Biotecnología (UNAM, Campus Cuernavaca) y tres semanas antes del procedimiento experimental fueron trasladadas a la sala del bioterio que pertenece al Laboratorio de neurobiología molecular y celular del mismo Instituto. Las ratas tuvieron acceso *ad libitum* a agua y alimento (Harlan Laboratories, Teklad Global). El ciclo luz-oscuridad fue de 12:12h encendiéndose la luz a las 7 am. La temperatura se mantuvo a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Restricción de movimiento (RES). Se utilizó un tubo de acrílico de 23.5 cm de largo por 7 cm de diámetro con perforaciones adelante y atrás para permitir la entrada de aire y evitar el sobrecalentamiento. Los tubos poseen tres ranuras para colocar la tapa, lo que permite ajustar el restrictor al tamaño de la rata. La tapa tiene un orificio en la parte inferior que permite que la cola de la rata quede libre. (McIntyre *et al.*, 1999, Lombardo *et al.*, 2001)(Figura 7). El animal se colocó dentro del tubo de acrílico que impide el movimiento por 30 min. Todas las manipulaciones se hicieron siempre entre las 10:00 y 12:00 am.

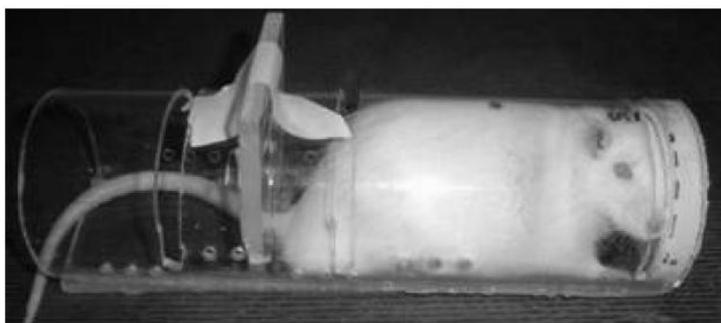


Figura 7. Imagen de una rata dentro del restrictor de Movimiento (RES).

Todos los animales fueron pesados 3 veces a lo largo de los 14 días que duró el protocolo, en los días 1 (D1), 9 (D9) y 13 (D13).

Las 21 ratas se dividieron de la siguiente manera. El número de individuos por grupo se encuentra entre paréntesis:

CI (5): Controles intactos manipuladas sólo para pesar (D1, D9, D13) y sacrificar (D14).

RAg45' (5): Sometidas a RES por 30 minutos una sola ocasión (D14) y sacrificadas 45 minutos después de que salieron del restrictor.

RCr24h (5): Sometidas a estrés RES (30 minutos) por 13 días consecutivos (D1 a D13) y sacrificadas 24 horas después de salir el último día del RES (D14).

RCr45' (6): Sometidas a estrés RES (30 minutos) por 14 días consecutivos (D1 a D14) y sacrificadas 45 min después de que salieron del RES (D14).

Los animales fueron sacrificados por decapitación con guillotina. De todos los animales se extrajo el cerebro y se congeló en hielo seco inmediatamente. Posteriormente fueron almacenados a -70°C. También se colectó la sangre troncal, se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 25 min obteniendo alícuotas de suero que se guardaron a -20°C.

6.2 Determinaciones Bioquímicas

Radioinmunoensayos

La técnica de radioinmunoensayo (RIA) se basa en la competencia por un anticuerpo entre la molécula problema (fría) y la misma molécula pero agregada en concentración conocida y marcada radioactivamente (caliente). Se puede cuantificar la molécula problema gracias al desplazamiento de la molécula de interés por la molécula marcada al competir por la unión a un anticuerpo. La cantidad de molécula de interés se calcula a partir de una curva estándar, cuando se detecta mayor cantidad de radioactividad entonces se tiene menor cantidad de la molécula fría en la muestra y viceversa

6.2.1. Corticosterona en suero.

Se preparó una dilución 1:500 del suero almacenado a -20°C (previamente descongelado a T° ambiente) en buffer de RIA (10mM de fosfatos pH 7.5, 150mM de NaCl y 0.1% de gelatina). Se calentó a 90°C durante 10 min para separar la corticosterona de las transcortinas y así obtener a la corticosterona total del suero. Se tomó por duplicado un volumen de 500 µl (dilución 1:500), se adicionó anticuerpo contra corticosterona hecho en conejo (ICN Farmaceutics) (1:1200) y se agregaron 100µl de Corticosterona tritiada (3H-CORT) (ICN Farmaceutics) equivalente a 10 000 cuentas por minuto (cpm). Se dejó incubando durante toda la noche a 4°C.

Se preparó una curva estándar con las siguientes concentraciones de corticosterona: 25, 50, 100, 250, 500 y 1000pg (MP Biomedicals). Se agregaron 100 µl de anticuerpo contra corticosterona y 100 µL de 3H-CORT.

Se prepararon por triplicado los siguientes tubos necesarios para el ensayo:

- Totales (T): 800 µL de buffer + 100 µL de 3H-CORT
- Unión inespecífica (NSB): 600 µL de buffer +100 µL de 3H-CORT

- Bo (Unión anticuerpo y ligando marcado radioactivamente): 500 μ L de buffer + 100 μ L de 3H-CORT+ 100 μ L de anticuerpo contra corticosterona.

- *Control estándar interno* (suero de rata control): diluido (1:500) calentado y tratado de igual forma que las muestras. Se tomaron 50, 100 250 y 500 μ L y se completaron a 500 μ L con buffer de RIA. También se le añadieron 100 μ L de anticuerpo y de 3H-CORT.

Se adicionaron a todos los tubos -menos a los totales-, 200 μ L de Carbón Dextran (ICN, Farmacéutica). Se agitaron e incubaron 20 min a 4°C. Se centrifugaron 15 min a 4°C a una velocidad de 3000 rpm (Beckman J-6). Se extrajo el sobrenadante y se colocó en viales para lector de cuentas por minuto. Se adicionaron 4 mL de líquido de centelleo, se dejaron en reposo por 12 h y se cuantificó en un contador β (Beckman).

6.2.2 Tirotropina (TSH)

Se tomaron 50 μ L del suero de rata y se agregaron a 150 μ L de buffer de RIA (50 mM de fosfatos pH 7.5+150mM NaCl + 1 % BSA +50mM EDTA). Se preparó la curva estándar (por triplicado) con 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg de TSH (NIDDK) en 200 μ L de buffer de RIA. Se prepararon Totales (Sin Buffer de RIA), NSB (300 μ L de Buffer de RIA) y B0 (200 μ L de Buffer de RIA). Se prepararon diluciones de sueros de rata bajo distintas condiciones:

- Control estándar interno 1: tubos con suero de rata control en volúmenes de 5, 10, 25 y 50 μ L llevados a 200 μ L con buffer de RIA.
- Control estándar interno 2: los mismos volúmenes del control estándar 1 de suero de rata expuesta a 4°C durante 1 hora.

Se agregaron a todos los tubos 100 μ L de anti-TSH (1:375,000) excepto a los totales y NSB y se dejaron incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Se adicionaron 100 μ L de ¹²⁵I-TSH (10 000 cpm) y se dejaron incubando a temperatura ambiente de nuevo por entre 18 y 24 horas.

Se agregaron 100 μ L de anticuerpo secundario anticonejo hecho en cabra (1:40) a todos los tubos con excepción de los totales. Se agregaron 100 μ L de suero normal de conejo (1:50) y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. Se agregó un mililitro de polietilenglicol (PEG) 4% en PBS.

Se centrifugó a 4000 rpm durante 30 min y se aspiró el sobrenadante con una bomba de vacío, y se contó finalmente la radioactividad en un contador de radiación y (minigamma).

Las cantidad de Corticosterona y TSH de los sueros fue calculada usando el software ENRI que utiliza la función logit/log a partir de las las cpms de cada curva estándar. Las curvas estándar de

cada RIA y los controles internos fueron graficados en forma semilogarítmica (Figura 8). La sensibilidad del ensayo de CORT fue de 20 ng/ml y del de TSH 0.5 ng/ml.

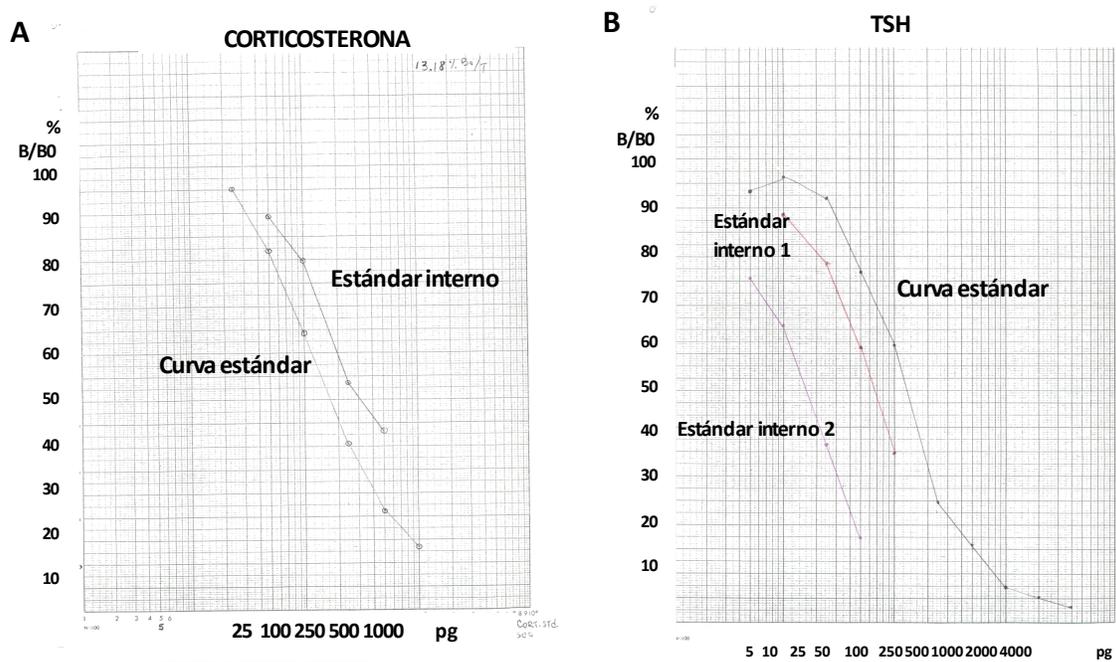


Figura 8. Curvas estándar para los RIAs de Corticosterona (A) y TSH (B). El estándar interno 1 corresponde al suero normal de rata y el 2 a suero de rata expuesta a 4°C durante una hora. Los puntos en la gráfica se calcularon con la fórmula $B = (\text{cpm-NSB})/B_0$.

6.3. Hibridación *In situ*.

La hibridación *in situ* es una técnica molecular anatómica que nos permite observar la distribución y cuantificar niveles de expresión de ARNm de un gen específico. En esta tesis se siguió la metodología de Gutiérrez-Mariscal et al., (2012).

Tratamiento del material y del agua.

Todo el material de vidrio y metal que se empleó para esta técnica se horneó a 180°C durante toda la noche. El agua que se usó para esta sección fue grado miliQ-UF (Millipore) (resistencia 18 mΩ/cm) se filtró (0.22µm) y se recolectó directamente en botellas de vidrio previamente horneadas. Posteriormente se esterilizó en autoclave a 120 libras de presión por 20 minutos.

6.3.1 Obtención de cortes

Se obtuvieron rebanadas horizontales de 18 µm de grosor de los cerebros congelados. Para rebanar se utilizó un criostato (Bright Cryostat/Microtome Model). Durante el procedimiento la temperatura del mismo se mantuvo a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$. El tejido fue colectado directamente en portaobjetos cargados positivamente (Superfrost Plus, Fisher) de 25 x 75 x 1.0 mm. Antes de rebanar los cerebros experimentales, se realizaron pruebas de cortes coronales y sagitales con el fin de colocar el mayor número de rebanadas por portaobjetos. El primer corte se realizó de forma sagital (3 mm de grosor) desechando el lóbulo temporal izquierdo. El segundo y tercer cortes fueron coronales: el segundo se realizó en la parte caudal del cerebro eliminando todo el cerebelo y el tallo cerebral y el tercero fue de 2.5 mm de grosor desde la zona más rostral del cerebro hacia la parte caudal (Figura 9 A).

Las regiones de interés fueron colectadas en series. La serie 1 constó de 6 láminas (cada una con 4 rebanadas) y las series 2 a la 4, de 8 (con 3 rebanadas por lámina). El primer corte se colocó en la posición 1 de la lámina 1, el segundo en la posición 1 de la lámina 2 y así sucesivamente hasta completar el número de láminas por serie. Cuando se llegó a la última lámina de cada serie, el siguiente corte se colocó en la posición dos de la primera lámina. Así hasta completar 3 ó 4 cortes por lámina (Véase ejemplo en Figura 9C). Cada serie se dividió para contener núcleos de interés reportados tanto por Heuer *et al.*, (2000) como por los antecedentes de la distribución de los ARNm de vías TRHérgicas en varios núcleos del cerebro (De Gortari *et al.*, 2005, Martínez-Chávez, 2009).

A continuación se describe qué núcleos de interés se encuentran en las cuatro series colectadas. Los valores entre paréntesis delante de la serie corresponden al rango en milímetros de distancia del bregma en el plano horizontal que abarcó cada serie.

- Serie 1 (-8.1 a -7.6): PVN y la banda diagonal de broca, parte horizontal (HDB) del septum.
- Serie 2 (-7.6 a -6.6): banda diagonal de broca, parte vertical (VDB) del septum, y los núcleos del tálamo reuniens (Re), paraventricular parte anterior (PVA), ventromedial, ventral posterior y ventromedial posterior (VM, VP, VPM), y reticular (Rt).

- Serie 3 (-6.6 a -5.6): septum medio (MS), septum lateral ventral (LSV) e intermedio (LSI); del tálamo: el reticular (Rt), la parte anterior del núcleo paraventricular del tálamo (PVA), y el tálamo anterior medio (AM) y ventral (AV)
- Serie 4 (-5.60 a -4.28) contiene: subdivisión lateral dorsal del septum (LSD); del tálamo: el núcleo anteroventral (parte dorsolateral y parte ventromedial), el anterodorsal (AVDL, AVVM y AD) y el paraventricular en su parte posterior (PVP).

Las rebanadas se colectaron de forma consecutiva en la serie 1; de las series 2 y 3 se colectó una rebanada y se desechó la siguiente. En la serie 4 se colectó un corte por cada 2 de desecho. Antes de comenzar la serie 1 y entre cada serie se colectó una rebanada en una lámina por separado. Estas rebanadas se tiñeron con azul de metileno (0.03%) para asegurar que se comenzó y terminó cada serie en el nivel dorso-ventral correcto. Las rebanadas ya colectadas se mantuvieron todo el tiempo en congelación y se almacenaron hasta su uso a -70°C .

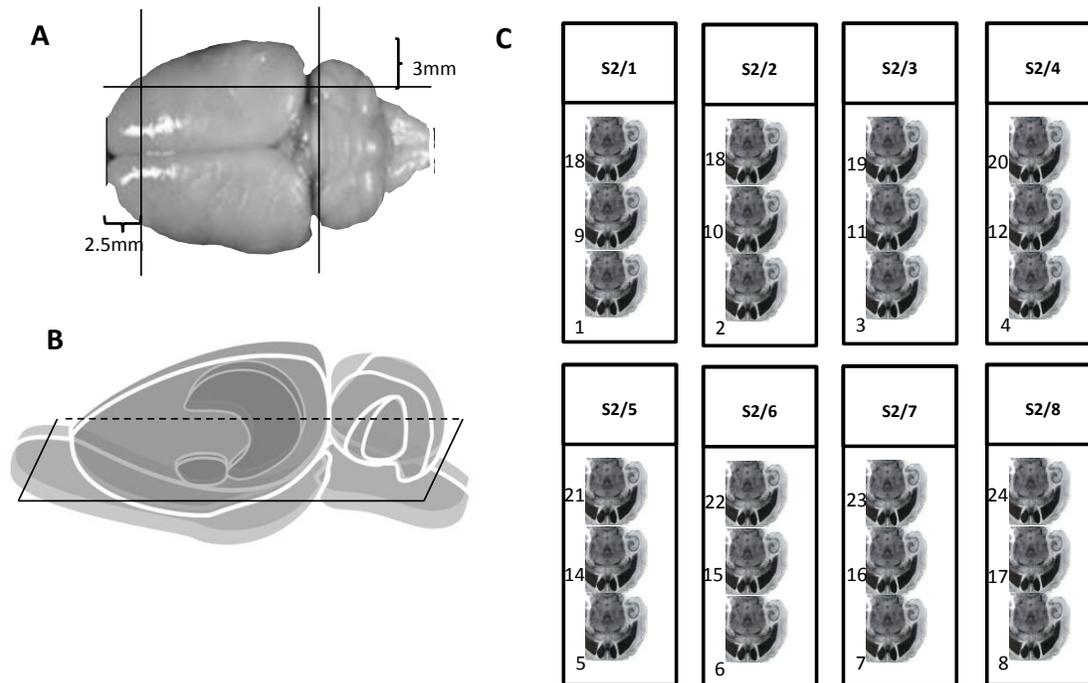


Figura 9. Obtención y organización de los cortes de cerebro de rata en diferentes planos. **A)** Vista superior de un cerebro de rata, la línea horizontal muestra el corte sagital y las líneas verticales los cortes coronales realizados previos a la obtención de rebanadas. **B)** Diagrama del cerebro donde se muestra la orientación de las rebanadas horizontales. **C)** Serie 2 (S2), el número después de la diagonal es el número de lámina. La numeración debajo de las rebanadas indica el orden de colocación de las rebanadas en cada lámina.

Para la hibridación *in situ* de esta tesis, en total se seleccionaron 36 láminas integradas por los grupos CI, RAg45' y RCr45' los cuales mostraron los cambios más claros por restricción crónica o aguda; y 10 láminas para la sección de pruebas de revelado explicada más adelante. Se utilizaron 3 láminas por animal de las series 3 y 4 los cuales contuvieron la mayoría de núcleos talámicos de donde se tienen antecedentes de cambios del ARNm de TRH bajo estrés psicológico (García-Vázquez., 2006).

6.3.2. Obtención de la sonda de ARN marcada con ³⁵S.

Para la hibridación *in situ* fue necesario preparar un transcrito complementario al gen de interés. En esta sección se describe la obtención de transcrito complementario al ARNm del TRH-R2 por la técnica de la transcripción *in vitro*. Posteriormente, se determinó la incorporación del nucleótido radioactivo a la sonda que se sintetizó. Si la eficiencia de esta reacción es igual o mayor al 90 % de incorporación del nucleótido radiactivo, se procede a la purificación del transcrito.

6.3.3. Transcripción *in vitro* de la sonda de ARN antisentido del gene del TRH-R2.

Se usaron 125 µCi de ³⁵S-UTP (New England, NEG039H Actividad específica 2000 Ci/mmol) para la transcripción *in vitro* de la sonda antisentido del TRH-R2. La marca radioactiva se secó en un evaporador (SAVANT) durante 10 min.

Se partió de 1 µg de plásmido (pcDNA3 5.4kbp) previamente linearizado con la enzima *Hind III* (R01045, Biolabs) y buffer Ncb2 (a 37 °C, Biolabs) (Figura 10). Se desnaturalizó el linearizado en agua a punto de ebullición (88 °C aproximadamente) durante 3 minutos, (se usó 1 µg de linearizado por cada 125 µCi).

Las concentraciones y cantidades usadas para la mezcla de transcripción se muestran en la

Tabla 2.

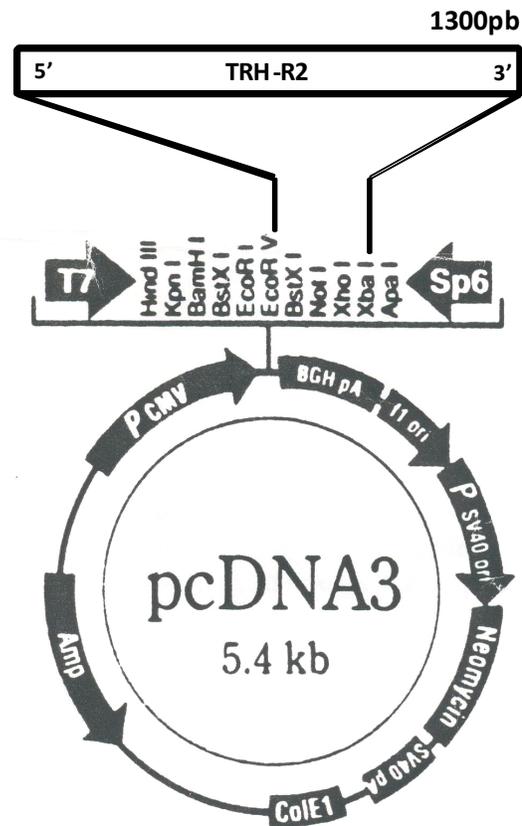


Figura 10. Plásmido pcDNA3 que contiene el cDNA del TRH-R2 usado para la transcripción *in vitro*. Se muestran los sitios de restricción con que cuenta el plásmido y los sitios entre los cuales se encuentra el fragmento del cDNA del TRH-R2 de rata del nucleótido 328 al 1641 (Cao *et al.*, 1998). Plásmido donado por el Dr. O'Donell.

Tabla 2. Mezcla de transcripción *in vitro*.

Solución o Reactivo	Cantidad
H ₂ O libre de ARNsas	2.1 µl
Buffer 10X (roche)	1 µl
DTT 0.1M	1.2 µl
Inhibidor de ARNsa 40 u/µl	0.7 µl
rNTPs 2.5mM	2.4 µl
UTP 10µM	2.8 µl
TOTAL	10.2 µl

Al tubo que contenía el nucleótido radioactivo se le adicionaron 4.5 μl de la mezcla de transcripción *in vitro*, 1 μg de plásmido (2 μl) y 1 μl de SP6 RNA polimerasa (40 u/ μl , Roche). Se realizó la transcripción en un baño a 37°C durante una hora.

A la reacción de transcripción se le agregó: DNAsa I (10 u/ μl , Roche), la cual en este paso digiere el plásmido templado; 1 μl de enzima inhibidora de ARNasas (40u/ μl) (stock de 10u/ μl); y 1 μl de ARNt (10mg/ml). Se dejó incubando la reacción 45 min a 37 °C.

6.3.4. Determinación del rendimiento de sonda obtenida y extracción de la sonda de ARNm del TRH-R2 antisentido.

La reacción anterior se detuvo con una solución llamada RIBOSTOP, que contiene: acetato de sodio 0.6M, EDTA 10 mM y SDS 1%, llevando la reacción a un volumen final de 50 μl

De los 50 μl se tomó 1 μl para cuantificar la eficiencia de la transcripción *in vitro*; al μl se le agregaron 24 μl de una solución: EDTA 10mM pH 8.0, SDS 0.1%, y tARN 0.5mg/ml. Los 25 μl resultantes se dividieron en 4 volúmenes equivalentes y se colocaron cada uno de estos sobre cuadrados de papel DEA 81 de 1 x 1 cm (este papel es un material con carga positiva que atrapa moléculas con carga negativa como los ácidos nucleicos). Dos de los cuatro papeles se lavaron como se indica a continuación y dos permanecieron sin lavar.

Lavados: se realizaron 5 lavados de 5 minutos con una solución de fosfato de sodio dibásico 0.5M. Después se lavaron un minuto en agua desionizada (milliQ) y para secar los papeles, se colocaron por un minutos en etanol (100%). Se dejaron secando y se colocaron por separado en viales a los que se agregó 5 mL de líquido de centelleo a base de tolueno (PPO 0.08%, POPOP 0.01% en tolueno). Se cuantificaron las cpm en un contador de radiación β (Beckman). La lectura de cpm indicó que los papeles sin lavar tuvieron en promedio 587,293 cpm, siendo esta cantidad el 100 % de radioactividad, mientras que los papeles que fueron lavados tuvieron 539,467 cpm. Lo anterior indica que la incorporación de la marca radioactiva al transcrito fue del 92%.

Habiendo verificado que se consiguió un buen porcentaje de incorporación de la marca a la sonda, se prosigió a la purificación del ARN del TRH-R2 ³⁵S- [α UTP] antisentido. A los 49 μl restantes se les agregó 50 μl de fenol y 50 μl cloroformo-alcohol isoamílico (49:1), se centrifugó a 7000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo la fase acuosa a la que se agregaron 2 μl de NaCl 5.5M (1/25 del volumen) y 150 μl de etanol absoluto 100% (3 volúmenes) y se dejó precipitando una hora a -70°C.

Se centrifugó durante media hora a 13 500 rpm a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla en 50 μl de DTT 0.1M. Se agregaron 0.04 volúmenes de NaCl 4.4M y 3 volúmenes de etanol absoluto frio y se dejó precipitando a -70°C durante una hora. Al término de esa hora, se centrifugó a 13 500 rpm 30 minutos a 4°C y se retiró el sobrenadante. Se agregaron 0.25 volúmenes l de DTT 0.1M y se almacenó a -70°C en un contenedor que protege al usuario de la exposición a la radioactividad.

6.3.5. Preparación del tejido para la hibridación *in situ*.

Se colocaron las láminas de interés en gradillas de metal a temperatura ambiente y se sometieron a un tren de fijado y lavados en el siguiente orden:

- Paraformaldehído 4% diluido en PBS 1x durante 10 minutos. (PBS 10X: NaCl 1.36 M, KH_2O_4 14.7mM, Na_2HPO_4 80mM, KCl 26.8 mM, H_2O desionizada).
- 2 veces en PBS 1X durante 5 minutos cada vez.
- Acetilación. 10 minutos en SSC 4X + Anhídrido Acético al 0.25% + TTNH_2 0.1M. (SSC 20X pH 7.0: NaCl 3M, Citrato de Sodio 0.3M).
- SSC 2X durante 2 minutos.
- Lavados de deshidratación con concentración creciente de etanol 2 min en cada uno de: 75, 80, 95 y 100%
- 5 minutos en cloroformo
- Dos lavados finales en etanol 100% durante 2 minutos cada uno y se dejaron secando a temperatura ambiente.

6.3.6. Preparación del cocktail de hibridación.

De la resuspensión de las cuentas por minuto obtenidas, el rendimiento total de la extracción de la sonda fue de 1 697 024 cpm/ μl del transcrito antisentido del TRH-R2. Para un área de tejido que queda cubierta con un cubreobjetos de 24 x 40 mm, se usa el volumen de la cocktail de hibridación que contenga 500 000 cpms. Nuestras láminas contenían tejido que se cubre con un cubreobjetos de 22 x 50mm por lo que ajustamos a un volumen con contuviera 750 000 cpms. Entonces, usamos 0.442 μl de la sonda antisentido para el ARN del TRH-R2 por lámina a hibridar (ver Tabla 3).

Cocktail de hibridación. Para cada lámina se debe usar: 0.9 μl DTT 1M, 0.442 μl de la sonda (previamente desnaturalizada a 65°C durante 5 min) y 58.658 μl de la *mezcla de hibridación* (ver Tabla 4). Se preparó *cocktail* para 55 láminas, las cantidades usadas de cada componente se muestran en la tabla 3. El *cocktail* se almacenó durante algunos minutos a 55°C hasta su uso.

Tabla 3. Mezcla de hibridación (Paso 1). Para 55 láminas (μL)	
DTT 1M	49.5
³⁵ S ARNm TRH-R2	24.3
Mezcla de hibridación	3226.2

Tabla 4. Mezcla de hibridación (Paso 2). Para 55 láminas (μL)	
Dextran sulfato	330
SSC 20X	330
Tris HCl 1M ph 8.0	825
H ₂ O libre de ARNasa	181.5
Denhardts 100X**	33
DTT 1M	33
DNA de esperma de salmón (10 mg/ml)*	82.5
Formamida	1.65 ml
SDS 10% (se agrega al final)	165

*Desnaturalizado durante 3 minutos a 88°C aproximadamente.

**Resuspendido

6.3.7. Preparación de Cámaras húmedas.

El proceso de hibridación del transcrito en el tejido de interés ocurre en unas cajas de plástico cerradas y a 55°C. Para mantener la humedad dentro de las cajas y evitar que se deshidraten los tejidos, en la tapa de las cajas se colocó papel absorbente cubriendo todo el fondo y se vertieron 30 ml de 50% de formamida/SSC 1X. Encima se colocó parafilm, perforándolo con una aguja estéril para permitir que la humedad pasara.

6.3.8. Hibridación.

A cada lámina se le colocaron 60 μl del cocktail de hibridación y se cubrió el tejido con parafilm del tamaño exacto que abarcara todos los cortes y con cuidado que al colocar el parafilm se lograra

esparcir el cocktail de hibridación sobre todos los cortes de la lámina. Las láminas se dejaron hibridando en posición horizontal durante 12 horas a 55°C en las cámaras húmedas antes mencionadas.

6.3.9. Lavados post-hibridación.

Se retiró el parafilm de las láminas dentro de un vaso de precipitados con solución SSC 1x a temperatura ambiente. Los lavados se realizaron en agitación en 600 ml de las siguientes soluciones en orden:

- SSC 1X durante 15 minutos a 37°C.
- Buffer de ARNasa 1X: NaCl, Tris HCl 1M pH8, EDTA pH 8.
- ARNasa (50 µg/ml) en buffer de ARNasa durante 1 hora a 37°C.
- SSC 1X por 15 minutos a 65°C.
- SSC 0.5X por 15 minutos a 65°C.
- SSC 0.1X por 30 minutos a 65°C dos veces.
- SSC 0.1X por 5 minutos a temperatura ambiente.
- Al final se deshidrató el tejido con un tren de etanoles de 2 minutos cada uno: 70, 80, 95 y dos veces de etanol absoluto (100%). Se dejó secando a temperatura ambiente.

6.3.10. Exposición a Emulsión fotográfica.

Dado que en este proceso se utilizan reactivos fotosensibles, se trabajó en el cuarto oscuro verificando previamente que no se filtrara la luz. La emulsión fotográfica (NTB, Kodak. Diluida 1:1 con agua) fue colocada en un baño a 45°C (Imperial III, Lab-line instruments). Cada lámina fue sumergida 5 segundos en la emulsión. Una vez emulsionadas, las láminas se dejaron secando en posición vertical por 1 hora aproximadamente sobre una gradilla, teniendo cuidado en que no se tocaran entre ellas o tocaran la gradilla. Posteriormente se guardaron en cajas negras herméticas que aseguran oscuridad total. Las cajas fueron guardadas en bolsas negras a las que se introdujo sílica seca para evitar la humedad excedente y se mantuvieron en exposición en oscuridad a 4°C.

6.3.11. Pruebas de revelado.

Como en el laboratorio se realizó por primera vez la hibridación *in situ* del ARNm del TRH-R2 en cortes horizontales que contuvieran núcleos talámicos y septales, fue necesario realizar varias

pruebas de revelado. Esto permitió definir tiempos de exposición específicos para los núcleos de interés. Se revelaron láminas con cortes de todos los grupos experimentales en distintos momentos posteriores a la exposición a la emulsión. Después de analizar cada una de las pruebas se decidió si se revelaban todas las láminas experimentales o si se continuaba dejando las láminas más tiempo con la emulsión. Así, se obtuvieron pruebas de revelado de los días 22, 45 y 47 posteriores al inicio de la exposición a la emulsión. Finalmente se decidió que el día 50 de exposición se revelarían todas las laminillas. En total se revelaron 45 láminas como se indica a continuación.

6.3.12. Revelado.

Para revelar la señal de la sonda radioactiva, se hizo un tren de revelado en el cuarto oscuro verificando, como en el tratamiento con la emulsión, que hubiera oscuridad total. En estas condiciones, se colocaron las láminas en rejillas de vidrio y se realizó el procedimiento de revelado que a continuación se describe verificando que la temperatura de las soluciones fuera de entre 14-15 °C al momento de comenzar. No es recomendable trabajar a más de 15C.

Proceso de revelado:

- 2 minutos y medio en Revelador (D19, Kodak). El revelador (112 g) se adicionó poco a poco a 700 ml de agua destilada caliente (máximo 52 °C) y se colocó de inmediato sobre hielo.
- 40 segundos en agua destilada - ácido acético al 2%.
- 2 veces en Fijador (GBX-Kodak) durante 2 minutos. Se tomaron 280 ml de fijador y se agregaron 5 volúmenes de agua destilada.

Dejando las láminas sumergidas en el fijador se expusieron a luz de seguridad (luz roja) durante cuatro minutos. Transcurrido este tiempo, se encendió la luz del cuarto oscuro y se trasladaron las láminas a la campana del laboratorio principal. Se raspó la emulsión del lado que no hay tejido y se enjuagaron las láminas en otro contenedor, antes de iniciar el tren de lavado. Se onde sometieron a un tren de lavado y secado como se describe a continuación:

Proceso de lavado:

- 5 minutos en agua destilada
- tren de etanol en concentraciones ascendentes con duración de 3 minutos cada uno: 75, 80, 95 y 100 % (dos veces en etanol absoluto).
- 3 min en Xilol (Baker) (dos veces).

Al terminar se cubrieron las láminas con medio de montaje (Cytoseal 60, Richard Alan Scientific) y cubreobjetos de 22x50mm (Fisher). Se dejaron secando sobre un porta laminillas en la campana de extracción (encendida) toda la noche.

6.4 Cuantificación de la señal positiva para el ARNm del TRH-R2

Hibridación in situ. La señal del ARNm del TRH-R2 se cuantificó usando una video cámara (3CCD, Sony) montada sobre un microscopio Axiosop (Carl Zeiss), una platina motorizada y un programa analizador de imágenes Mercator (Explora Nova). Las regiones se delinearon y cuantificaron en campo oscuro. Se cuantificaron de 3-6 rebanadas por animal. Para cuantificar el PVT se tomó en cuenta su división anatómica en PVA y PVP (Paxinos y Watson, 2004) que en el análisis de las láminas resultó evidente. La Figura 11 muestra en campo claro el contorno en que se delineó el núcleo cuantificado mostrando 4 niveles ventro-dorsales del PVA y 3 del PVP. Todas las cuantificaciones fueron realizadas en una sola sesión para evitar variación por causas ajenas a las experimentales. Para obtener la cantidad de señal de un animal se promediaron todas sus rebanadas cuantificadas. Para obtener el valor por grupo experimental se promediaron los valores individuales.

6.5. Análisis Estadísticos.

El peso total y la ganancia de peso a lo largo del protocolo se analizaron analizados por medio de análisis de varianza (ANOVA) de dos vías (2v) de medidas repetidas donde los dos factores fueron el tiempo (D1, D9 y D13) y el tratamiento (sin restricción crónica y RCr). Si la ANOVA resultó significativa se realizó pruebas *post-hoc* de Bonferroni para identificar los grupos diferentes del control. Se realizaron pruebas de "t" student cuando se compararon solamente dos grupos. La significancia fue establecida $p < 0.05$. Para los análisis de CORT y TSH se hizo una ANOVA de una vía. Los resultados de la cuantificación de la señal positiva para TRH-R2 en la hibridación *in situ* fueron analizados por ANOVA para comparar entre los 3 grupos cuantificados. Se realizaron pruebas de "t" student para comparar dos grupos entre sí. La significancia estadística se estableció en $p < 0.05$.

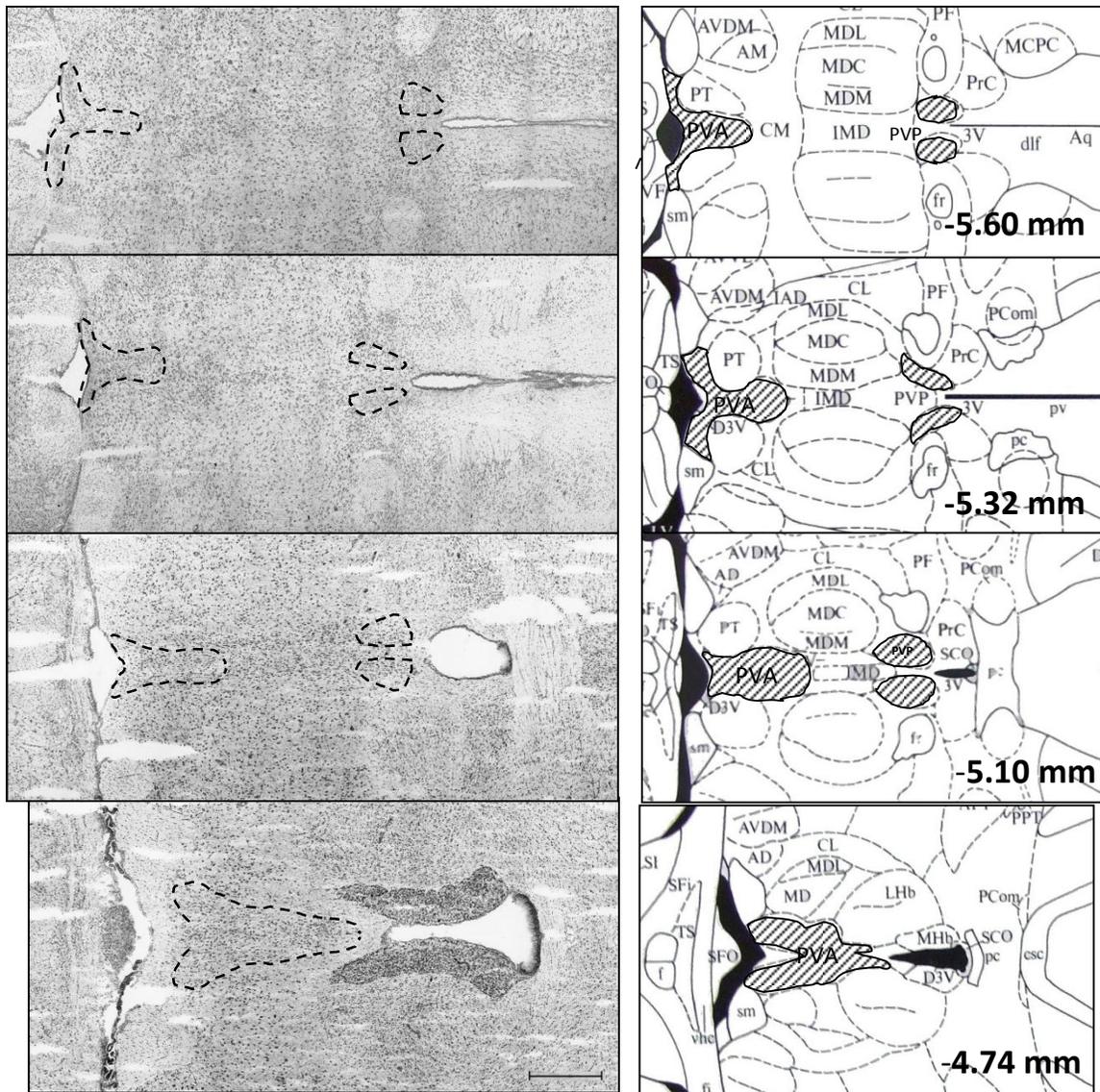


Figura 11. Regiones del PVT cuantificadas. En la columna de la izquierda se muestra en campo claro (tinción de Nissl con azul de metileno) rebanadas del PVA y PVP equivalentes a las rebanadas cuantificadas. La columna de la derecha muestra el diagrama equivalente (Paxinos y Watson, 2004) a la tinción de Nissl y la distancia en mm con respecto al bregma. La región en barras (panel de la derecha) equivale a la región encerrada en líneas punteadas (panel de la izquierda). La barra negra en la esquina inferior derecha de la columna de la izquierda equivale a 300 µm.

7. RESULTADOS

7.1. Cambios en el peso por exposición a RES aguda y crónica.

El peso inicial promedio de todos los animales fue de 371.2 ± 10.5 g. El experimento constó de 4 grupos experimentales, 2 de los cuales se manipularon hasta el último día del experimento entonces, para fines del análisis de los cambios en el peso del D1 al D13, se agrupó a los animales en dos categorías "Naive" (no sometidos al tratamiento) y restricción crónica (RCr). El peso inicial promedio del grupo "Naive" fue de 375.8 ± 16.5 g y el de restricción crónica de 367.1 ± 14.0 g, es decir todos los animales iniciaron con un peso similar. Al día 9 los animales "Naive" pesaron en promedio 396.96 ± 14 g y los de restricción crónica 383.41 ± 13.89 g, lo que indicó una tendencia a que los animales manipulados pesaran menos, aunque la diferencia no fue significativa. Para el día 13 los animales "Naive" pesaron 408.96 ± 14.62 g y los de restricción crónica 383.22 ± 14.16 g. Utilizando ANOVA de 2 vías de medidas repetidas no mostró diferencias significativas por el tratamiento, ni por la interacción, sólo a lo largo del tiempo hubo cambio en el peso lo que indicó que las ratas, independientemente del tratamiento tuvieron un peso distinto a lo largo del tiempo. (ANOVA: TIEMPO: $F_{2,38} = 14.87$; $p < 0.0001$; TRATAMIENTO: $F_{1,38} = 0.65$; $p = 0.4294$; INTERACCIÓN: $F_{2,38} = 1.73$; $p = 0.1917$).

Del día 9 al día 13 (Figura 12B) hubo una ganancia de peso significativamente menor en los animales estresados crónicamente comparada con los "Naive" (prueba de t $p = 0.036$): inclusive los animales estresados crónicamente ya no ganaron peso si no que en promedio lo perdieron, la ganancia fue de -1.58 ± 40.6 % comparados contra la ganancia del día 9 al día 13 de los "Naive" ($100 \pm 15.97\%$). La ganancia acumulada (peso del día 1 menos peso del día 13) no mostró diferencia significativa por prueba de t ($p=0.128$) pero como se observa en la figura 12C, se observó una tendencia a que los animales estresados crónicamente ganaran menos peso a lo largo de todo el procedimiento experimental, respecto a los animales "Naive". La ANOVA de 2 vías de medidas repetidas mostró, como para los pesos totales, que sólo hubo efecto del tiempo en la ganancia de peso (ANOVA: TIEMPO $F_{2,38}=14.87$; $p<0.0001$; TRATAMIENTO: $F_{1,38}=1.0$; $p = 0.3137$; INTERACCIÓN: $F_{2,38}= 1.73$; $p = 0.1917$).

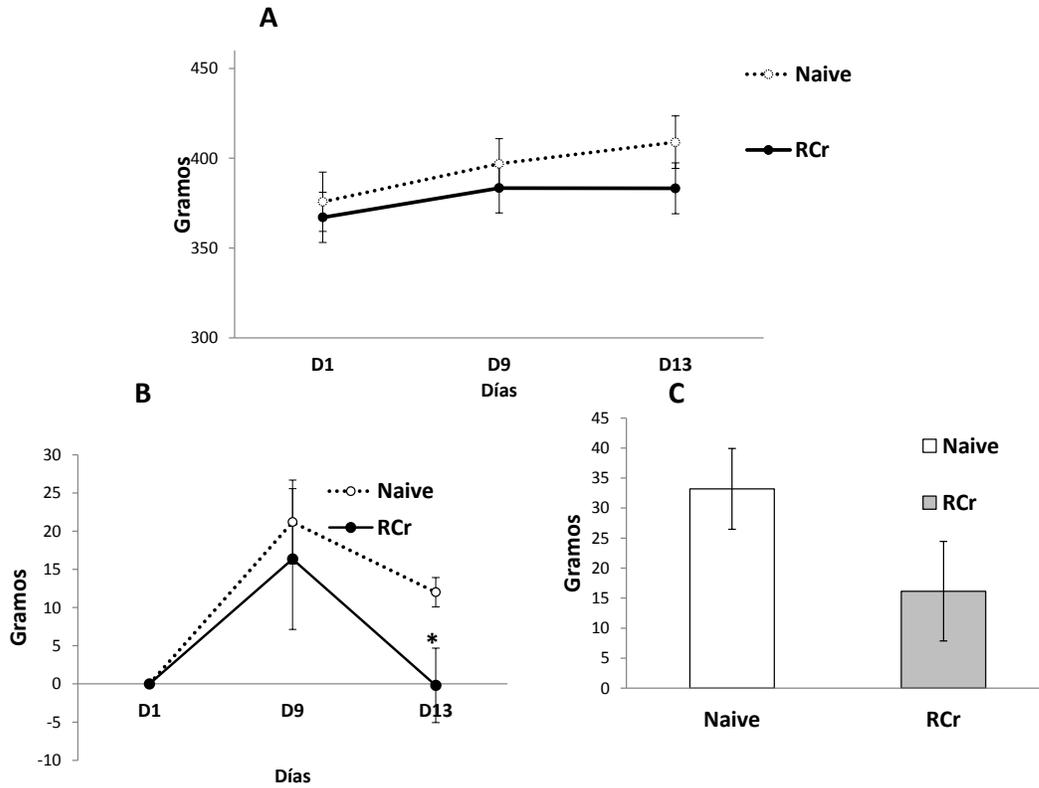


Figura 12. A) Peso total al día 1, 9 y 13. B) Ganancia de peso al día 9 y 13. C) Ganancia total del día 1 al 13. $n = 10$ (Naive) y $n = 11$ (RCr: restricción crónica). Las líneas tanto en el panel A como el B corresponden al promedio \pm e.s.m. * $p < 0.05$ por prueba de t .

7.2. Actividad del eje HPA y HPT.

El producto final de la activación de los ejes HPA y HPT son la CORT y las HT, respectivamente. En estos experimentos se midieron la CORT y la TSH como indicadores de posibles cambios en los ejes endócrinos por la restricción tanto crónica como aguda. Aunque la TSH no es el producto final de activación del eje HPT sí es buen indicador de activación del eje HPT a los tiempos de sacrificio utilizados en este trabajo (45 min). Los niveles de CORT y TSH se muestran en la Figura 13. No se detectaron diferencias significativas entre grupos para los niveles de CORT ($F_{(3,15)} = 2.194$, $p = 0.131$) ni para TSH ($F_{(3,17)} = 1.137$, $p = 0.363$). Sin embargo, los niveles de corticosterona del grupo sometido a restricción aguda y sacrificado 45 min después (RAg45') tendieron a aumentar con respecto al promedio del grupo control intacto (CI: 100 ± 41.26 % vs RAg45': 192 ± 62.73 %) pero probablemente debido a la dispersión de los datos, estos no alcanzaron significancia estadística " t " ($p = 0.092$). Los niveles de tirotrópina en el grupo de restricción crónica sacrificado 45 min después del último periodo de restricción (RCr45: 130.72 ± 20.31 %) tendieron a aumentar

respecto al grupo CI ($100 \pm 12.32\%$), y a disminuir en el grupo de restricción crónica sacrificado 24 horas después del último periodo de RES (RCr24h ($85.31 \pm 25.81\%$)). El grupo RAg45' es el que presentó menos diferencia comparado contra el grupo CI (RAg45: 109.42 ± 9.42) (Figura 13B).

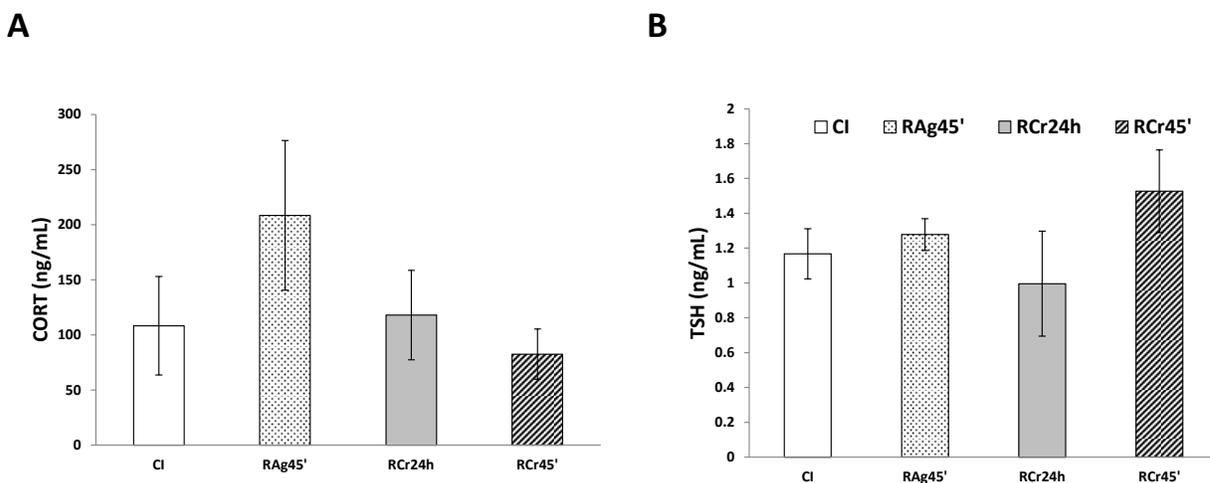


Figura 13. Niveles de Corticosterona (A) y Tirotrópina (B) en suero obtenidos mediante RIA. $n=5$ para los grupos CI, RAg45' y RCr24h; $n=6$ para el grupo RCr45'. Las barras de cada barra corresponden a \pm e.s.m.

7.3 Hibridación *in situ* del ARNm del TRH-R2

La distribución en el cerebro de la rata y los cambios en el PVT del ARNm del TRH-R2 se muestran a continuación comenzando con las pruebas de revelado.

7.3.1. Pruebas de revelado

En la figura 14 se muestra el aumento progresivo de la intensidad de la señal de la señal del ARNm del TRH-R2. Se realizaron dos pruebas, la primera al día 22 y la segunda al día 47 en las que se reveló una lámina de cada uno de los grupos incluidos en la his. Desde la primera prueba de revelado, día 22, se observó señal positiva para la expresión del TRH-R2 (Figura 14A). Al analizar en el microscopio en campo oscuro se observaron los granos de plata revelados de manera adecuada por la metodología estandarizada en el laboratorio, pero no se observaron diferencias claras entre los grupos experimentales, además que la señal fue tenue por lo que se decidió continuar la exposición a la emulsión en el resto de las láminas.

La segunda prueba de revelado se realizó al día 47 de exposición a la emulsión. Nuevamente, se observaron en campo oscuro los granos de plata revelados de manera adecuada y la señal en la lámina del grupo CI fue mayor que la del día 22 y además se comenzaron a notar diferencias de señal entre grupos experimentales en algunos núcleos de interés como el núcleo paraventricular del tálamo anterior, el núcleo anterior y el ventral posterior (Figura 14).

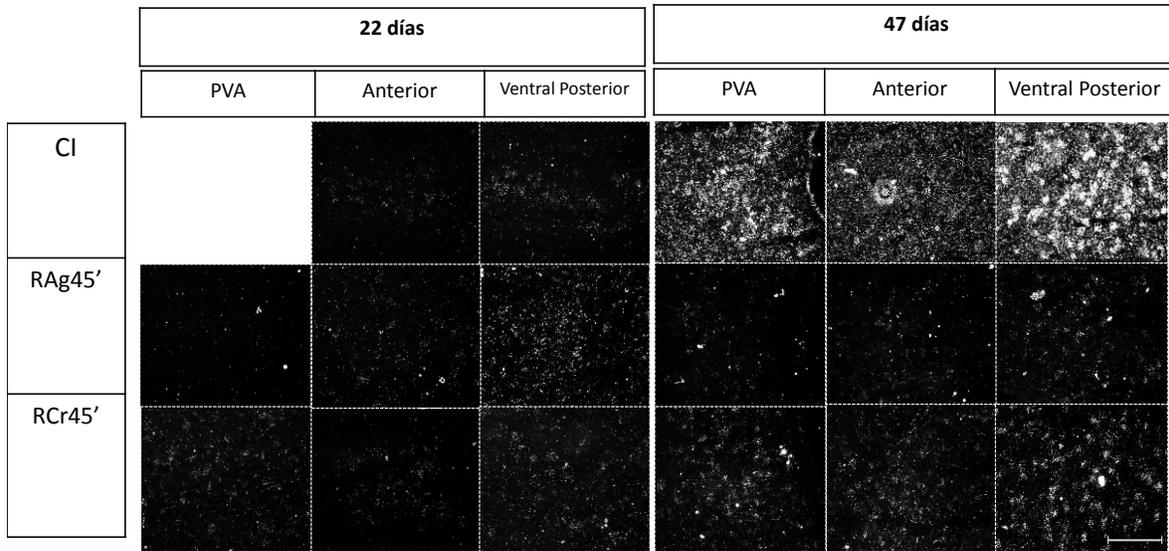


Figura 14. Pruebas de revelado para la his del ARNm de TRH-R2. Comparación cualitativa de la señal entre grupos en el núcleo paraventricular talámico anterior (PVA) y los núcleos anterior y ventral posterior talámicos al día 22 y 47 de exposición. La barra corresponde a 300µm.

7.3.2 Expresión del ARNm del TRH-R2 en el cerebro de la rata.

El total de las láminas hibridadas fueron reveladas después de 50 días de exposición. Como resultado de los análisis cualitativos descritos en la sección anterior, la exposición de los tejidos a este tiempo, permitió observar la distribución del ARNm del TRH-R2, y realizar el análisis cualitativo en condiciones basales en regiones talámicas y otras estructuras cerebrales. Para esto se seleccionó un corte de una rata del grupo CI en el que se apreciara la mayoría de núcleos de los que se tienen antecedentes de cambios en la cantidad del ARNm del TRH-R2 por hibridación *in situ* en el tálamo. En esta rebanada fue claro que el ARNm del TRH-R2 se expresa abundantemente en varios núcleos talámicos. Gracias a que los cortes fueron horizontales, en la misma rebanada pudimos observar la expresión del ARNm del TRH-R2 en estructuras del telencéfalo (corteza, septum e hipocampo), del diencefalo y del mesencefalo.

Se hizo una composición de 378 fotografías con el objetivo 5x para armar la vista completa de la señal positiva para el ARNm del TRH-R2 (Figura 15) en una rebanada de cerebro de la rata. Se identificaron las regiones y núcleos de acuerdo a Paxinos y Watson (2004). En la Tabla 3 se describe cualitativamente lo observado. El núcleo paraventricular y los núcleos ventrales talámicos mostraron la mayor intensidad de señal positiva para el ARNm del TRH-R2. También hubo señal fuerte aunque un poco menos intensa en los núcleos posteriores, anteriores, centrales y mediales. En el mesencefalo también se observó señal alta pero de menor intensidad comparada con la señal talámica. Las capas profundas del colículo superior mostraron señal de bastante

intensidad, seguido del núcleo geniculado dorsolateral. El septum medio mostró señal positiva pero en una intensidad media comparada contra los núcleos de alta señal (talámicos). Los núcleos donde se encontró positiva pero dispersa fueron el globus pallidus, caudado-putamen, y las cortezas temporal y parietal.



Figura 15. Distribución del ARNm del TRH-R2 en estado basal (Grupo CI) en un corte horizontal. Las líneas que delimitan las regiones y núcleos se trazaron con respecto al atlas (Paxinos y Watson, 2004). La rebanada corresponde a aproximadamente -5.32 mm con respecto al Bregma horizontal. 3V, tercer ventrículo; pc, comisura posterior; f, fórnix; LV, Ventrículo lateral; CA, Cuerno de Amonn; DG, Giro dentado; fr, fasciculus retroflexus; Rt; tálamo reticular; sm, stria medullaris. La barra corresponde a 1 mm.

Tabla 5. Distribución y análisis cualitativos del ARNm del TRH-R2 en el cerebro de la rata							
Región	Núcleo	Abreviación	ARNm TRH-R2	Región	Núcleo	Abreviación	ARNm TRH-R2
Telencéfalo							
<i>Corteza</i>	Parietal, área 1	Par1	+		Centromedial	CM	+++
	Parietal, área 2	Par2	+		Centrolateral	CL	++
	Temporal, área 1	Te1	+		Interanterodorsal	IAD	+++++
	Temporal, área 3	Te3	+		Intermediodorsal	IMD	++
					Mediodorsal	MD	+++
<i>Septum</i>	Septum Medio	SM	++		Parafascicular	Pf	+++
					Paraventricular Anterior	PVA	++++
	Globus pallidus	GP	++		Paraventricular Posterior	PVP	+++++
	Caudado Putamen	CPu	++		Posterior	Po	++
					Posterior Lateral	PL	++++
<i>Hipocampo</i>	Subículum	S	+++		Radiado Superior	Str	++
					Ventrolateral	VL	+++++
Diencéfalo					Ventrolateral Posterior	VPL	+++++
<i>Tálamo</i>	Anterior Ventral Ventrolateral	AVVL	++++		Ventromedial Posterior	VPM	++++
	Anterior Ventral Dorsomedial	AVDM	++++				

Mesencéfalo							
	Braquium inferior del colículo	BIC	+++				
	Capa blanca profunda del colículo superior	DpWh	++++				
	Capa gris profunda del colículo superior	DpG	++++				
	Capa gris intermedia del colículo superior	InG	++				
	Capa blanca intermedia del colículo superior	InWh	+++				
	Geniculado Mediodorsal	MGD	+++				
	Geniculado Dorsolateral	DLG	++				
	Gris Central	CG	+				
	Supragenículado	SG	++++				
	Pretectal Anterior	APT	++				

+++++ densidad máxima; ++++ muy denso; +++ denso; ++ moderado; + bajo o señal dispersa

7.3.3. Niveles de ARNm del TRH-R2 en el núcleo paraventricular del tálamo bajo estrés agudo y crónico.

En la cuantificación del ARNm del TRH-R2 en el PVT se tomó en cuenta las subdivisiones que hay en el núcleo: paraventricular talámico anterior (PVA) y el posterior (PVP). Se cuantificaron todas las láminas que presentaron señal para ambos subnúcleos. Para el PVA de los grupos CI y RAg45'

se cuantificaron de 3 a 6 rebanadas por rata, mientras que del RCr45' de 3-4 rebanadas. La cuantificación del PVP se realizó de 2 a 4 rebanadas para los grupos CI y RAg45' y de 2 a 3 rebanadas para el RCr45' por cada animal.

En el PVA aumentó la señal del ARNm del TRH-R2 de los grupos bajo estrés, tanto el RAg45' ($189.23 \pm 34.43\%$) como el RCr45' ($189.01 \pm 27.19\%$) comparados contra el grupo CI ($100 \pm 3.53\%$). Sólo hubo significancia estadística entre el CI vs RCr45' por prueba de *t* ($p = 0.03$). Cabe aclarar que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre el RAg45' vs RCr45' (Figura 16). En el PVP se observó que la señal del ARNm del TRH-R2 aumentó sólo en el grupo RCr45' ($188.15 \pm 26.19\%$) vs CI ($100 \pm 24.12\%$) (Figura 15). Hubo diferencia significativa en éste aumento por prueba de *t* ($p = 0.048$).

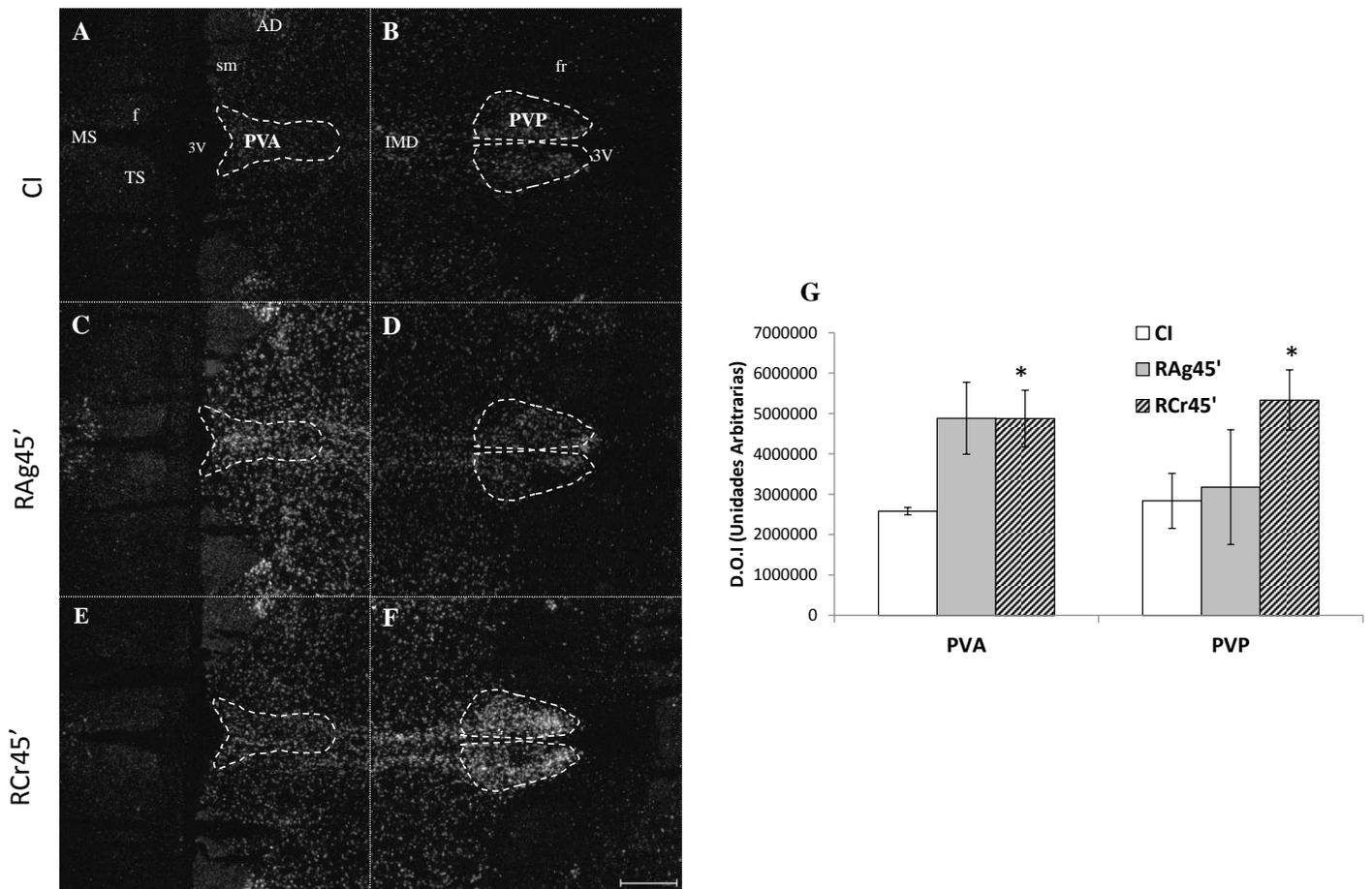


Figura 16. Imagen representativa del ARNm del TRH-R2 en el PVT bajo estrés crónico y agudo. PVA y PVP del grupo CI (A-B), RAg45' (C-D) y RCr45' (E-F). G, Cuantificación de la señal mostrada en el núcleo PVA y PVP. CI, n = 4; RAg45', n = 3; RCr45', n = 4. Las fotografías mostradas del PVA y PVP corresponden a aproximadamente -5.10 mm con respecto al bregma. *, $p < 0.05$ por prueba de "t" vs CI. Las barras en la gráfica corresponden al promedio \pm e.s.m; la barra blanca en F indica la escala que equivale a 500 μ m.

8. DISCUSIÓN

Uno de los objetivos del laboratorio consiste en describir la participación de las vías TRHérgicas en respuesta a estrés en varias estructuras del sistema límbico. Una región del cerebro considerada como parte del sistema límbico es el tálamo. En el tálamo García-Vázquez (2006) encontró cambios por RT-PCR en el ARNm del TRH-R1 y el ARNm del TRH-R2 en respuesta a estrés psicológico por RES. Bajo estrés crónico describió que el ARNm de TRH-R1 aumentó, mientras que el ARNm del TRH-R2 disminuyó tanto en animales bajo estrés crónico como agudo. Es así que, el objetivo de esta tesis fue mostrar los cambios anatómicos en la expresión del mensajero del TRH-R2, en el tálamo.

8.1. Cambios en el peso corporal y la actividad de los ejes HPA y HPT bajo estrés crónico y agudo.

En el análisis del cambio en el peso corporal durante el desarrollo del estrés crónico se observó que los animales (RCr) mostraron menor ganancia de peso. Esto nos muestra que en animales restringidos crónicamente por 14 días, cuanto más crónico es el estrés (duración en días) menor es la ganancia de peso comparado con los no restringidos.

Se ha demostrado que el estrés ejerce fuertes efectos sobre la conducta alimenticia y el apetito, dependiendo de la respuesta diferencial basada en la intensidad del estresor y su duración. Por ejemplo, estresores psicológicos crónicos (inmovilización y restricción de movimiento) inhiben la ingesta alimenticia (Shimizu *et al.*, 1989); esto podría relacionarse con la disminución en la ganancia de peso de animales RCr observada en nuestro experimento. Especialmente, el PVT recibe inervaciones de orexina desde el hipotálamo posterior, el lugar exclusivo dónde se produce este péptido (Kirouac *et al.*, 2005). Siendo que las orexinas se encargan de mantener la conducta de alerta, incluyendo el alertamiento durante el apetito, podría haber una relación entre la actividad de las orexinas desde el hipotálamo y su efecto en el PVT durante el estrés.

8.2. Actividad de los ejes HPA y HPT.

Se cuantificaron la corticosterona (CORT) y tirotrópina (TSH) séricas como indicadores de la actividad de los ejes HPA y HPT, respectivamente. Aunque el aumento de CORT en los animales bajo estrés agudo no fue estadísticamente significativo, hubo una tendencia a mostrar un aumento de casi el doble de CORT en los niveles cuantificados en los animales RAg por lo que hubo un claro efecto de la restricción aguda en la activación del eje HPA. Esta tendencia reproduce resultados previos del laboratorio en los que el estrés agudo por RES causó aumento significativo de CORT en los animales sacrificados a los 45 minutos después de la restricción por 30 minutos (Rebolledo-Solleiro, 2005; García-Vázquez, 2006). Los niveles de CORT en los animales estresados crónicamente (RCr45 y RCr24h) no mostraron diferencia contra los CI, lo cual indica habituación a la restricción de movimiento.

En este trabajo medimos la activación del eje tiroideo a partir de la cuantificación sérica de TSH. Si bien la TSH sérica no es el indicador directo de la actividad de este eje al no ser el producto final de su activación, la restricción de movimiento modula la actividad del eje tiroideo (Rebolledo-Solleiro, 2005). La TSH no mostró cambios significativos bajo restricción crónica o aguda, pero en el grupo RCr45' hubo una tendencia a aumentar los niveles de TSH que será necesario reanalizar en posteriores repeticiones de este experimento. Aun así, se sabe que algunos tipos de estrés inhiben al eje HPT ante estrés agudo. La inmovilización y la exposición a choques eléctricos en la cola, ambos considerados estresores más severos que la restricción de movimiento, causan la disminución de TSH en el suero (Cizza et al., 2006). Posiblemente, los niveles de TSH en animales bajo RES aguda no muestran disminución por el tiempo de sacrificio que fue 45 minutos después del RES y que se sabe bajan por RES aguda a los 15 min (Rebolledo-Solleiro, 2005).

8.3. TRH-R2 en el PVT y la respuesta al estrés crónico y agudo.

Esta tesis muestra por primera vez datos anatómicos de los cambios en el mensajero del TRH-R2 en animales en respuesta a estrés por RES agudo y crónico. Combinar un modelo de estrés como el RES y la técnica de hibridación *in situ* nos permitió observar los cambios en los mensajeros de forma más fina.

El ARNm del TRH-R2 en el PVP aumentó sólo en el grupo sometido a restricción del movimiento de manera crónica, no habiendo cambio (ni tendencia) en los animales expuestos a una sola restricción. En el PVA tanto el grupo sometido a restricción aguda como el de crónica aumentaron los niveles de ARNm del TRH-R2 respecto al grupo intacto pero el aumento fue estadísticamente significativo sólo en el grupo de restricción crónica. Estos resultados indican que existe una respuesta diferencial de la comunicación TRHérgica en respuesta al estrés por restricción del movimiento en el PVT anterior y posterior. Al parecer, los niveles de ARNm del TRH-R2 responden al estrés indistintamente de la condición crónica o aguda de éste en el PVA mientras que en el PVT la respuesta ocurre sólo en la condición crónica.

Se podría haber esperado en general una disminución del ARNm del TRH-R2 en el PVT por los antecedentes por RT-PCR donde disminuyeron por restricción crónica (García-Vázquez, 2006). Se sabe que la comunicación TRHérgica es específica para cada núcleo y se puede sugerir que mientras en algunos otros núcleos estaría disminuyendo la expresión del TRH-R2 (consistente con los antecedentes por RT-PCR bajo el mismo tratamiento y condiciones) en el PVT aumenta en respuesta al estrés.

Pero, ¿qué significa este cambio en el ARNm del TRH-R2 en el PVT bajo RES crónica y aguda? En cuanto a la regulación de la expresión de los receptores de TRH, se sabe que el TRH-R1 disminuye su expresión al aumentar el TRH administrado en cultivo de adenohipófisis (Schomburg y Bauer, 1995). También en cultivo, el número de estos receptores en la pituitaria disminuye por la presencia de hormonas tiroideas mientras que aumenta por estrógenos y glucocorticoides (Mason et al., 2000).

Sin embargo, no se ha medido el cambio del ARNm del TRH-R2 al estimular con TRH en ningún tipo de cultivo celular ni tampoco si glucocorticoides, estrógenos u otras moléculas, podrían regular los niveles de este ARNm y/o de su proteína. Tampoco se tienen antecedentes de la regulación *in vivo* de este receptor. No se ha investigado cuáles son los factores de transcripción o los reguladores para el gen del TRH-R2, por lo que no sabemos si los cambios en el ARNm del TRH-R2 se deben a alguna de las moléculas involucradas en la respuesta al estrés.

En un acercamiento al estudio del TRH-R2 *in vivo* se encontró que en ratones hembra carentes del gen de TRH-R2 (TRH-R2 KO) se incrementó la conducta relacionada a la depresión (Sun et al., 2009) comparada con la de animales silvestres. Los animales TRH-R2 KO no presentaron cambios en la actividad del eje HPT por lo que se aportó evidencia de la participación del TRH extrahipotalámico en la regulación de las conductas de ansiedad y depresión.

El PVT presenta receptores para otras moléculas que se han relacionado con la respuesta al estrés: a glucocorticoides y mineralocorticoides, a orexinas tipo 1 y 2 (Marcus et al., 2001), sustancia P, colecistoquinina (CCK) (Otake, 2005). Algunas evidencias de la participación de estos receptores se observaron por ejemplo, en mayores niveles de ACTH después de inyectar un antagonista de CCK en ratas antes de RES con estrés crónico por frío previo, comparando con animales control (Bhatnagar *et al.*, 2000). Las orexinas inyectadas directamente en el PVP resultan ansiogénicas mientras que la inyección de antagonistas de orexinas son ansiolíticas (Li *et al.*, 2010). La participación de todos estos tipos de comunicación ante estresores o modelos de estrés de tipo psicológico hablan de la compleja integración de señales en el PVT, varios de ellos específicos del PVP a los que se puede agregar la respuesta diferencial del TRH-R2 evidenciada en esta tesis.

Otra pregunta emergente después de analizar estos resultados fue, ¿de dónde provienen las proyecciones TRHérgicas que actúan en este núcleo? Los núcleos TRHérgicos con aferencias al PVT son (Heuer *et al.*, 2000): el núcleo arcuato, el dorsomedial, el ventromedial y el lateral del hipotálamo, el preóptico medio, el reticular tegmental del mesencéfalo, el pedúnculo pontino y el núcleo del rafe. Varios de estos núcleos están involucrados en mediar la respuesta al estrés o son parte de la transmisión de tipo sensorial. Basándonos en la fisiología del PVT, las funciones en la respuesta al estrés del PVA Y PVP y en la participación del PVP en la habituación al estrés, sugerimos que probablemente no sean las mismas aferencias TRHérgicas las del PVA que las del PVP. Li y Kirouac (2012) mostraron recientemente que de las aferencias del núcleo reticular talámico (Rt) hacia el PVT, la parte más anterior se comunica con el PVA y la más posterior con el PVP. Cabe resaltar que el núcleo reticular talámico expresa altos niveles de ARNm de proTRH (Heuer et al., 2000. Ver figura 6 y tabla 1). Además, el PVP recibe entrada de información desde la parte ventral de la corteza prefrontal (infralímbica y peduncular profunda) enfatizando la posibilidad que el PVP podría estar asociado específicamente con una respuesta de inhibición. El Rt expresa mRNA del TRH por lo que posiblemente la comunicación TRHérgica es diferente entre el Rt y el PVA y PVP por las diferencias entre la distribución de las aferencias. Nuestros resultados y los hallazgos anatómicos recientemente descritos sugieren que mientras la comunicación TRHérgica del PVA no está participando en la habituación, si está involucrada en la respuesta al estrés ya que aumentan los niveles del ARNm del TRH-R2 tanto en el RES crónico como el agudo y

que la comunicación TRHérgica del PVP participa en la habituación al estrés, esto reflejado por el aumento del ARNm del TRH-R2 en la restricción crónica y no en la restricción aguda. Se sugiere la evaluación del ARNm del TRH en la parte ventromedial del Rt en este modelo de estrés para ver si hay también una respuesta diferencial entre las regiones que proyectan hacia el PVP o el PVA.

El hecho de observar cambios en el ARNm del TRH-R2 en un núcleo cerebral, no significa que tengan una relevancia a nivel de proteína. Es necesario investigar si los cambios aquí observados (ARNm) tienen consecuencia funcional es decir, si se reflejan cambiando también los niveles de receptor (proteína) por inmunohistoquímica, lo que se propone como un futuro análisis pues existen anticuerpos contra ambos tipos de receptores para TRH (Santa Cruz Biotechnology, Anticuerpos) bajo las mismas condiciones experimentales y así ir esclareciendo los cambios en la vía TRHérgica al menos para el PVP.

Aunque por autoradiografía de los receptores del TRH se encontró que estos están presentes en el PVT (Manaker *et al.*, 1985), no se tiene hasta la fecha una inmunohistoquímica del TRH-R2 que indique que la proteína se encuentra en las membranas celulares de estas neuronas. También se expresa en gran cantidad el ARNm del TRH-R1 en el PVT (Heuer *et al.*, 2000) dentro del mismo núcleo. Queda la pregunta si en las mismas neuronas del PVT se está expresando el de ARNm de ambos receptores del TRH. Para esto último se podría realizar hibridación *in situ* doble.

Ya que el objetivo de esta tesis consistió en estudiar el ARNm del TRH-R2 por hibridación *in situ*, en las mismas rebanadas se tienen otras regiones con núcleos talámicos, septales, hipocampales y de la corteza. En relación con el trabajo dónde se aplicó kindling amigdalino donde se encontró en estructuras talámicas como el núcleo ventromedial y el reuniens aumento en la expresión del ARNm del TRH-R2 (De Gortari *et al.*, 2005), y ya que el septum y el hipocampo son parte del sistema límbico del control de la respuesta al estrés, podría evaluarse si hay cambios en el mensjero de TRH-R2 en otras regiones de estas mismas rebanadas.

Broberger y McCormick (2005), investigaron mediante técnicas electrofisiológicas el papel del TRH en la actividad talamocortical. Propusieron que el TRH puede potencialmente controlar el estado de actividad a través de la depolarización tanto de las células talamocorticales como las neuronas gabaérgicas de los núcleos reticular y perigeniculado. Con lo anterior sugirieron que el TRH en las regiones analizadas podría tener un papel antiepiléptico. Adicionalmente, se sabe que existe correlación entre la actividad talámica y la amigdalina frente al miedo condicionado (tipo de estrés psicológico (Buchel *et al.*, 1998; LaBar *et al.*, 1998). Específicamete, se relacionó la actividad del PVT con la de la amígdala central en modelos de depresión (Zhu *et al.*, 2011). Con lo anterior podríamos sugerir que los cambios de los niveles en los elementos TRHérgicos en núcleos pertenecientes a las vías tálamo-amigdalinas y que además reciben información sensorial, podrían estar brindando un papel de neuromodulación o neuroprotección por parte del TRH así como se observó en otros núcleos responsivos al estrés en el trabajo de Broberger y McCormick.

La amígdala juega un papel fundamental en procesar los estímulos emocionales (Rosen y Domley, 2006), y se sabe que hay aferencias directas del PVT. En particular, con estrés psicológico la respuesta de la amígdala de la vías del TRH y del CRH se relacionan con la conducta de ansiedad y

de locomoción (Gutiérrez-Mariscal, 2012). Tanto el PVT como la amígdala expresan elementos de vías TRHérgicas y junto con los resultados de esta tesis se ha demostrado que bajo estrés psicológico se regula la comunicación TRHérgica en ambas estructuras. Mientras que la amígdala es uno de los centros principales del procesamiento de las emociones y el PVT se relaciona con la habituación al estrés, las conexiones entre estos núcleos nos hablan de la importancia de la vía talamo-amigdalina en el procesamiento del estrés crónico y agudo y de la participación del TRH y sus elementos de comunicación.

9. CONCLUSIONES.

La vía TRHérgica talámica está involucrada en la respuesta al estrés.

La comunicación TRHérgica en las subdivisiones anterior y posterior del núcleo paraventricular del tálamo, podría estar participando diferencialmente en la respuesta aguda o crónica al estrés.

En el PVP la expresión del ARNm del TRH-R2 aumenta en respuesta al estrés crónico, mientras que en el PVA aumenta tanto por estrés crónico como agudo.

La comunicación TRHérgica del PVP podría participar en la habituación al estrés involucrando al TRH-R2.

PERSPECTIVAS

- Se pretende cuantificar otras regiones en el tálamo que se sabe que son responsivas al estrés por RES Crónico o Agudo dentro de las mismas láminas de esta hibridación *in situ* para el TRH-R2. Sobre todo porque en las mismas láminas en las que se cuantificó el PVT también hay otras regiones del tálamo intramediolaminar que se sabe son responsivas al estrés.
- Realizar hibridaciones *in situ* para el TRH-R1 y la PPII en el PVP. Ya que en esta región están presentes estos elementos de la vía TRHérgica cuyo análisis nos acercaría a una mejor comprensión de la fisiología de la vía.
- Realizar hibridaciones *in situ* para el TRH, GR, CRH y CRH-R1 en la serie que contiene al PVN (S1).
- Repetir el experimento para aumentar la cantidad de animales por grupo y comprobar si todos los cambios en las mediciones y cuantificaciones realizadas en este experimento son reproducibles.

10. REFERENCIAS.

Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., Balderas, I., Ramirez- Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2005. Analysis of the stress response in rats trained in the watermaze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid

- receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 82, 306 – 319.
- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., García-Vázquez, A.I., Ramirez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2007. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem. Int.* 50: 404 – 417.
- Ahima R., Krozowsky Z., Harlan R. 1991. Type I corticosteroid receptro-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol.* 313: 522 - 38
- Akil H., Cappeau S., Cullinan W.E., Lechan R., Toni R., Watson S. y R. Moore. 1999. Neuroendocrine System I: Overview thyroid and adrenal axes. En Zigmond M., Bloom F., Landis S., Roberts J. y Squire L. *Fundamntal Neuroscience Academic Press.* Pp.-1127 - 1150
- Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Assenmacher, I., Astier, H., 1983. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology.* 37: 225 – 228.
- Armario A, Marti O, Gavald A, Giralt M, Jolín T. 1993. Effect of chroonic immobilization stress on GH and TSH secretion in the rat: Response to hypothalamic regulatory factors. *Psychoneuroendocrinology*, 18: 405 - 413
- Armario A, Martí O, Vallès A, Dal-Zotto S, Ons S. 2004. Long-term effects of a single exposure to immobilization on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: neurobiologic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*; 1018: 162 - 72.
- Armario A., Castellanos JM, Balasch J. 1984. Effec of acute and chronic psychogenic stress on corticoadrenal and pituitary-Thyroid hormones in male ratas. *Morm. Res.* 20, 241 - 245
- Bear M. F., B. W. Connors y M. A. Paradiso. *Neuroscience, exploring the brain.* Segunda edición Lippincott Williams & Wilkins. 2001. 855pp
- Bentivoglio M., Balercia G., Kruger L. 1991. The specificity of the nonspecific thalamus: the midline nuclei. *Prog Brain Res.* 87: 53 – 80.
- Bhatnagar S., Dallman M. 1998. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience.* 84: 1025 - 39.
- Bhatnagar S., Dallman M.F. 1999. The paraventricular nucleus of the thalamus alters rhythms in core temperature and energy balance in a state-dependent manner. *Brain Res.* Dec 18;851: 66 -75.
- Bhatnagar S., Huber R., Nowak N., y P Trotter. 2002. Lesions of the Posterior Paraventricular Thlamus block Habituation of Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Responses to Repeated Restraint. *Journal of Neuroendocrinology*, 14:403 - 410

- Bhatnagar S., Viau V., Chu A., Soriano L., Meijer O.C. y Dallman MF. 2000. A cholecystokinin-mediated pathway to the paraventricular thalamus recruited in chronically stressed rats and regulates hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Neurosci*; 20: 5564 – 5573.
- Boler j., Enzmann, K., Bowers, C.Y. y Schally A. V. 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline-amida. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37: 705 – 710.
- Broberger C. y McCormick D. A. 2005. Excitatory Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone in the Thalamus. *The Journal of Neuroscience*, 25: 1664 – 1673.
- Buchel C., Morris J., Dolan R.J., Friston K.J. 1998. Brain systems mediating aversive conditioning: an event-related fMRI study. *Neuron* 20: 947 – 957.
- Burgus, R., Dunn, T. Desaderio D., and Guillemin, R. 1969. Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF de origine ovine: mise en evidence par spectrometrie de masse de la sequence Pca-His-Pro-NH. *C.r: Acad. Sci. (Paris)*. 269: 1870 - 1873.
- Cao J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lembo P., Ahmad S., Walker P. 1998. Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem.* 273: 32281 – 32287
- Charli J.L. y Joseph-Bravo P. 2008. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje, Una ventan al quehacer científico. Primera edición, Edit. Impresor Apolo 53 - 64.
- Charli J.L., Cruz C., Vargas M.A., Joseph-Bravo P. 1988. The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int*;13(2):237-42.
- Chrousos G.P. y P.W. Gold. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. *Journal of the American medical association.* 267:1244-1252
- Chrousos G.P., Loriaux D., Gold P.W. 1988. The concept of stress and its historical development. En Chrousos B.P., Loriaux L.D, Gold P.W. *Mechanisms of physical and emotional stress.* Vol 245. *Advances in experimental medicine and biology.* New York: Plenum Press: 3 - 7.
- Cizza G., Brady L.S., Esclapes M.E., Blackman M.R., Gold P.W., Chrousos G.P. 1996. Age and gender influence basal and stress-modulated hypothalamic-pituitary-thyroidal function in Fischer 344/N rats. *Neuroendocrinology.* 64(6):440 - 8.
- Coste S.C., Murray S.E., Stenzel-Poore M.P. 2001. Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress. *Peptides.* 22: 733 - 41.
- Day H.E.W., Masini C.V. y Serge S. 2009. Reversible inactivation of the auditory thalamus disrupts HPA axis habituation to repeated loud noise stress exposure. *Brain Research.* 1276: 123 - 130

- De Gortari P., Uribe R.M., García-Vázquez A., Aguilar Valles A., Martínez A., Valdés A, Charli JL, Fernández-Guardiola A y P Joseph-Bravo. 2005. Amydala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochemistry International*, 48: 31 - 42
- de Kloet E.R., Joëls M., Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*. 6: 463 - 75.
- Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paull WK, Kaplan MM, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. 1988. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus *Endocrinology* Nov;123: 2291 - 7.
- Engelmann M., Landgraf R., Wotjak C.T. 2004. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*. 25: 132 - 49.
- Fernandes G.A., Perks P., Cox N.K.M., Lightman S.L., Ingram C.D. y Shanks N. 2002. Habituation and Cross-Sensitization of Stress-Induced Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity: Effect of Lesions in the Paraventricular Nucleus of the Thalamus or Bed Nuclei of Stria Terminalis. *Journal of Neuroendocrinology*, 14: 593 - 602
- Fuchs E., Flügge G. 2003. Chronic social stress: effects on limbic brain structures. *Physiol Behav*. 79: 417 - 27.
- Fujimoto J., Narayanan C. S., Benjamin J. E., Heinfliink M. y Gershengorn M.C. 1992. Mechanism of regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in stably transfected rat pituitary cells. *Endocrinology*. 130: 1879 – 1884
- García-Vázquez A. I. 2006. El estrés psicológico modula la actividad de las neuronas TRHérgicas en el sistema límbico. Tesis de Maestría. IBT,UNAM.
- Ginsberg A. B., Campéau S., Day H.E., Spencer R.L. 2003. Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotrophin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or Fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 1075 - 1083
- Girotti M., Pace T.W. W., Gaylord R., Rubin B., Herman J.P., Sepncer R.L. 2006. Habituation to repeated restrain stress is associated with lack of stress-induced c-fos expression in primary sensory processing areas of the rat brain. *Neuroscience*, 138: 1067 - 1081.
- Golub M. S., Campbel M.A., Kaufman F.L., Iyer P., Li Ling-Ho, Donald J.M., Morgan J.E. 2004. Effects of restraint stress in gestation: implications for rodents developmental toxicology studies. *Birth Defects Research(Part B)*, 71:26 - 36

- Gutiérrez-Mariscal M., de Gortari P., López-Rubalcava C., Martínez A., Joseph-Bravo P. 2008. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 33: 198 - 213.
- Gutiérrez-Mariscal M., Sánchez E., Rebolledo-Solleiro D., García-Vázquez A.I., Cote-Vélez A., Acasuso-Rivero C., Charli J.L., Joseph-Bravo P. 2012. The acute response of the amygdalar TRH system to psychogenic stressors varies dependent on the paradigm and circadian condition. *Brain Res*. 1452: 73 - 84
- Herman J.P., Figueiredo H., Mueller N.K., Ulrich-Lai Y., Ostrander M. M., Choi D. C., Cullinan W.E. 2003. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*. 24:151 - 80.
- Heuer H., Ehrchen J., Bauer K., Schäfer M. K. 1998. Region-specific expression of thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *Eur J Neurosci*. 10(4): 1465 - 78.
- Heuer H., Schäfer M. K., O'Donnell D., Walker P., Bauer K. 2000. Expression of thyrotrophin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* Dec 11;428(2): 319 - 36.
- Imaki T., Katsumata H., Miyata M., Nruse M., Imaki J., Minami S. 2001. Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Type 1 Receptor in Paraventricular Nucleus after acute stress. *Neuroendocrinology*, 73: 293 – 301.
- Itadani H., Nakamura T., Itoh J., Iwaasa H., Kanatani A., Borkowski J., Ihara M., Ohta M. 1998. Cloning and characterization of a new subtype of thyrotrophin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 250: 68 – 71.
- Jaferi A. y Bhatnagar S. 2006. Corticosterone Can Act at the Posterior Paraventricular Thalamus to inhibit Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Activity in Animals that Habituate to Repeated Stress. *Endocrinology*. 147: 4917 - 4930.
- Jaferi A., Nowak N., y S Bhatnagar. 2003. Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiology & Behavior*, 78: 365 - 373.
- Johnson E.O., Kamilaris T.C., Chrousos G.P. y Gold P.W. 1992. Mechanism of Stress: A dynamic Overview of Hormonal and Behavioral Homeostasis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 16: 115 - 130.
- Kirouac G. J., Parsons M. P., Li S. 2005. Orexin (hypocretin) innervation of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Res*, 1059: 179 - 188

- Knapaska E., Radwanska K., Werka T., Kaczmarek L. 2007. Functional internal complexity of amygdala: focus on gene activity mapping after behavioral training and drugs of abuse. *Physiol Rev.* 87: 1113 - 73.
- LaBar K. S., Gatenby J.C., Gore J. C., LeDoux J. E, Phelps EA. 1998. Human amygdala activation during conditioned fear acquisition and extinction: a mixed-trial fMRI study. *Neuron* 20: 937 – 945.
- Lechan R. y Fekete C. 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*, 153: 209 - 235
- LeDoux J. E. 2000. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci.* 23: 155 - 84.
- LeDoux J. E. 2003. The emotional brain, fear and the amygdala. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 23:727-738
- Li S. y Kirouac G. J. 2008. Projections From the Paraventricular Nucleus of the Thalamus to the forebrain, with special emphasis on the extended amygdala. *The journal of Comparative Neurology*, 506: 263 - 287.
- Li Y., Li S., Wei C., Wang H, Sui N, Kirouac GJ. 2010. Orexins in the paraventricular nucleus of the thalamus mediate anxiety-like responses in rats. *Psychopharmacology (Berl)*.212: 251 - 65.
- Li S. y Kirouac G. J.2012 Sources of inputs to the anterior and posterior aspects of the paraventricular nucleus of the thalamus. *Brain Struct Funct.*217: 257 - 73.
- Lightman S. L. 2008. The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *Journal of Neuroendocrinology.* 20: 880 - 884
- Lombardao K. A., Herringa R.J., Balachandran J.S., Hsu D.T., Backshi V.P., Roseboom P.H., Kalin N.H. 2001. Effects of acute and repeated stress on corticotropin-releasing hormone binding protein in mRNA y n rat amygdala and dorsal hippocampus. *Neuroscience letters*, 302: 81 - 84
- Manaker S., Winokur A., Rostene W. H., y Rainbow TC. 1985. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *The journal of neuroscience*, 5: 167 - 174.
- Marcus JN, Aschkenasi CJ, Lee CE, Chemelli RM, Saper CB, Yanagisawa M, Elmquist JK. 2001. Differential expression of orexin receptors 1 and 2 in the rat brain. *J Comp Neurol.* 435: 6 - 25.
- Mason G. A., Garbutt J. C., and Prange A. J. 2000. Thyrotropin-releasing hormone. Focus on basic neurology.
- McEwen B. S, Gianaros P. J. 2011. Stress- and allostasis-induced brain plasticity. *Annu Rev Med.* 62: 431 - 45.

- McEwen B. S. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *N. Engl. J. Med.* 338: 171 – 79
- McIntyre D.C., Kent P., Hayley S. Merali Z. y Anisman H. 1999. Influence of psychogenic and neurogenic stressors on neuroendocrine and central monoamine activity in phase and show kindling rats. *Brain Research*, 840: 65 - 74
- Morimoto M., Morita N., Ozawa H., Yokoyama K. y Kawata M. 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res*, 26: 235 - 69.
- Morris J. S., Ohman A., Dolan R. J. 1998. Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature*, 393: 467 – 70
- Morris J.S., Ohman A., Dolan R. J. 1999. A subcortical pathway to the right amygdala mediating “unseen” fear. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 1680 – 85
- Munck A., Guyre P., Holbrook N. 1984. Physiological functions of glucocorticoids during stress and their regulation to pharmacological actions. *Endocr Rev*, 5: 25 - 46
- Nakahara K., Fukui K., Murakami N. 2004. Involvement of thalamic paraventricular nucleus in the anticipatory reaction under food restriction in the rat. *J Vet Med Sci* 66: 1297 – 1300.
- Noguchi T., Makino S., Matsumoto R., Nakayama S., Nishiyama M., Terada Y., Hashimoto K. 2010. Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology*. 151(9):4344-55.
- O’Connor B. y O’Cuinn G. 1984. Localization of a narrow specificity throliberin hydrolyzing pryoglutmate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pin brain. *European Jorunal of Biochemistry*, 144, 271 - 278.
- O’Dowd BF, Lee DK, Huang W, Nguyen T, Cheng R, Liu Y, Wang B, Gershengorn MC & George SR. 2000. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Molecular Endocrinology* 14 183 – 193.
- Otake K. 2005. Cholecystokinin and substance P immunoreactive projections to the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *Neurosci Res*. 51: 383 - 94.
- Paxinos G . 1995. *The Rat Nervous System*. Second Edition Academic Press. P. 1136
- Paxinos G. y Watson C. 2004. *The rat brain: in stereotaxic coordinates*. Elsevier Academic Press.377
- Perello M. y Nilni E. A. 2007. The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front Biosci*, 12:3554-65.

- Prager E.M. y Johnson L. R. Stress at the synapse: signal transduction mechanisms of adrenal steroids at neuronal membranes. *Sci Signal*. 2009 Sep 1;2(86):re5.
- Pratt WB. 1990. Glucocorticoid receptor structure and the initial events in signal transduction. *Prog Clin Biol Res*, 322: 119 – 32.
- Rankin C. H., Abrams T., Barry R. J., Bhatnagar S., Clayton D. F., Colombo J., Coppola G, Geyer MA, Glanzman DL, Marsland S, McSweeney FK, Wilson DA, Wu CF, Thompson RF. 2009 Habituation revisited: an updated and revised description of the behavioral characteristics of habituation. *Neurobiol Learn Mem*, 92: 135 - 8
- Rebolledo -Solleiro D. 2005. Estudio del efecto del estrés agudo sobre el metabolismo del neuropéptido TRH en el sistema límbico. Tesis de licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM
- Rosen, J.R., Domley, M.P., 2006. Animal studies of amygdal function in fear and uncertainty: relevance to human research. *Biol. Psychiatry*, 73: 49 – 60
- Sánchez E., Praful P.S., Acharya R., Bodria M., Fekete C., Zavacki A.M., A.C. Bianco, Lechan R. M. 2008. Differential effects of refeeding on melanocortin-responsive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 149:4329 – 4335
- Saper C. B., 1982. Reciprocal parabrachial-cortical projections in the rat. *Brain Research*. 242: 33 - 40.
- Schaner P., Todd R. B., Seidah N. G., Nillni E. A. 1997. Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J Biol Chem*. 272:19958-68.
- Schomburg L. y Bauer K. 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 136(8):3480-5
- Shimizu N, Oomura Y, y Kai Y. 1989. Stress-induced anorexia in rats mediated by serotonergic mechanisms in the hypothalamus. *Physiol Behav*, 45:835-841.
- Straub R. E., Frech G. C., Joho R. H. y Gershengorn M. C. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 9514 - 8.
- Sun Y. y Gershengorn M. C. 2002. Correlation between basal signaling and internalization of thyrotropin-releasing hormone receptors: evidence for involvement of similar receptor conformations. *Endocrinology*, 143: 2886 – 2892.
- Sun Y., Lu X. y Gersherngorn M. C. 2003. G proteiin-CopuledCoupled Receptor Signalling in neuroendocrine systems. Thyrotropin-releasing hormone receptors – similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology*, 30: 87 - 97.

- Sun Y., Zupan B., Raaka B. M., Toth M., Gershengorn M.C. 2009. TRH-receptor-type-2-deficient mice are euthyroid and exhibit increased depression and reduced anxiety phenotypes. *Neuropsychopharmacology*. 34: 1601-16088.
- Thompson, R. F., y Spencer, W. A. 1966. Habituation: A model phenomenon for the study of neuronal substrates of behavior. *Psychological Review*, 73, 16 – 43.
- Uribe, R.M., Redondo, J.L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*, 58: 140 – 145.
- Wang W. y Gershengorn M. C. 1999. Rat TRH receptor type 2 exhibits higher basal signaling activity than TRH receptor type 1. *Endocrinology* 140: 4916 – 4919.
- Yen P. M. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*; 81: 1079 - 1142
- Zigmond M. J., Bloom F. E., Landis S. C., Roberts J. L. y Squire L. R., 1999. *Fundamental neuroscience* Academic Press. San Diego, California pp. 1137-1147.
- Zhu L., Wu L., Yu B., Liu X. 2010. The participation of a neurocircuit from the paraventricular thalamus to amygdala in the depressive like behavior. *Neurosci Lett*. 488: 81- 86