



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Localización de la enzima que degrada a TRH, la piroglutamil
peptidasa II (PPII) en el hipocampo de la rata adulta**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A

KARLA YAMILI VARGAS ORIHUELA

TUTORA

DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**

2013

AGRADECIMIENTOS

Es para mi motivo de inspiración y orgullo convivir y aprender de personas con admirable dedicación y amor por su trabajo, y su compromiso con la formación de los estudiantes que comienzan a adentrarse en el mundo científico. Por ello quiero reconocer el invaluable apoyo de mis tutores y maestros la Dra. Edith Sánchez Jaramillo, a la cuál agradezco profundamente el tiempo e interés hacia este proyecto, por transmitirme su valiosa experiencia y su apoyo incondicional; al Dr. Jean-Louis Charli Casalonga, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y la confianza que me brindó desde el primer momento. De manera especial, agradezco las ideas, observaciones y recomendaciones que me compartieron amablemente en cada una de las reuniones que tuvimos a lo largo de la realización de esta investigación.

Agradezco la orientación y aportaciones hechas durante los seminarios de grupo de la Dra. Patricia Joseph, la Dra. Rosa María Uribe, la Dra. Antonieta Cote Vélez, la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal y la Dra. Lorraine James Hoy.

A los miembros de mi comité de jurados el Dr. Víctor Manuel Rodríguez Molina, el Dr. Renato León Rodríguez y al Dr. Oscar Próspero García; por la dedicación de su valioso tiempo a la lectura y análisis de este trabajo.

A la Química Fidelia Romero Arteaga un reconocimiento a su trabajo y colaboración en la digestión y purificación de plásmidos; de igual manera al Q.F.B. Miguel Cisneros Ramírez por la realización de los radioinmunoensayos. Su apoyo técnico favoreció enormemente al proyecto. Al Sr. Manuel Villa Herrera y la Sra. Elena Martel por facilitar los materiales utilizados en los experimentos.

Por brindarme un ambiente de calidez y trabajo en equipo agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio Gabriela Berenice Gómez, Iván Lazcano, Adrián Pérez Maldonado, Israim Sotelo, Fernando Cazares, Carmen y Javier Iván Patiño.

A la facultad de ciencias de la UNAM por regalarme un ambiente maravilloso que despertó y fomentó mi curiosidad científica. Al Instituto de Biotecnología por abrirme las puertas a un mundo nuevo de trabajos e investigadores de alto nivel.

Finalmente quiero agradecer al personal del bioterio del Instituto de Biotecnología y al apoyo por otorgado por parte del CONACyT 107109 (ESJ), 61804 (JLC) y la DGAPA, UNAM IN211109 (JLC).

A Jan por ser mi mamá y mi amiga. Siempre serás mi ejemplo a seguir

A mi hermano Mauricio. Te quiero

ÍNDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	
1. Comunicación intercelular en el Sistema Nervioso Central (SNC)	9
1.1. Comunicación basada en la transmisión de señales sinápticas	9
1.2. Comunicación intercelular basada en la regulación neuroendócrina	9
ANTECEDENTES	
1. Hormona liberadora de tirotrópina (TRH)	11
1.1. Características generales	11
1.2. Biosíntesis	11
1.3. Función neuroendócrina	12
1.4. Función neuromoduladora	14
1.5. Mecanismos de inactivación	15
2. Piroglutamil peptidasa II (PPII)	16
2.1. Características generales	16
2.2. Distribución del ARNm a través del sistema nervioso central	17
2.3. Regulación del metabolismo de la TRH en la adenohipófisis	18
2.4. PPII de tanicitos	19
2.5. Regulación central a nivel	20
3. El Hipocampo	21
3.1. Proyecciones intrínsecas del circuito hipocampal trisináptico	21
3.2. Cuerno de Ammon	21
3.3. Giro Dentado	21
4. Efectos de la acción de la TRH en el hipocampo	22
4.1. Distribución de los elementos involucrados en la comunicación	
TRHérgica	22
4.2. Evidencias que asocian a la TRH con la fisiología del hipocampo	23

4.3. Ensayos electrofisiológicos que relacionan a la TRH con la transmisión GABAérgica	24
5. Ácido γ - aminobutírico (GABA)	25
5.1. Características generales	25
5.2. Biosíntesis	25
5.3. Distribución de la enzima GAD en el hipocampo	26
5.3. Tipos de interneuronas GABAérgicas del hipocampo	27
JUSTIFICACIÓN	29
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	30
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Material y H ₂ O	31
2. Animales	31
2.1. Tratamiento de animales con hormona tiroidea, 3, 5, 3' triiodotironina (T3)	31
2.2. Obtención de cerebros por el método de perfusión cardiaca y congelamiento	31
2.3. Procesamiento de los cerebros	32
3. Radioinmunoensayo de tirotropina (TSH) en suero de rata	32
4. Purificación y linearización de los plásmidos	32
5. Marcaje de las sondas	33
5.1. Transcripción <i>in vitro</i> de la sonda PPII con ³⁵ S α -UTP	33
5.2. Transcripción <i>in vitro</i> de la sonda GAD65 con digoxigenina 11 α -UTP	34
6. Hibridación <i>in situ</i> sencilla con la sonda PPII ³⁵ S- α -UTP	35
6.1. Tratamiento de pre- hibridación para tejidos perfundidos	35
6.2. <i>Buffer</i> de hibridación	36
6.3. Hibridación <i>in situ</i>	36
6.4. Lavados post- hibridación	36
6.5. Análisis a nivel microscópico de la señal de PPII por densitometría	37

7. Doble hibridación <i>in situ</i> con las sondas PPII ³⁵ S α-UTP y GAD65 digoxigenina 11 α-UTP ..	37
7.1. Tratamiento de pre- hibridación para tejidos perfundidos	37
7.2. Buffer de hibridación	37
7.3. Doble hibridación <i>in situ</i>	38
7.4. Lavados post- hibridación y detección de la digoxigenina	38
7.5. Incubación con α-dig-peroxidasa y revelado con un sustrato colorido	39
7.6. Cuantificación de células positivas mediante el uso de un analizador de imágenes	39
8. Presentación de los datos y análisis estadístico de los resultados	39

RESULTADOS

1. Efecto del hipertiroidismo sobre la concentración de TSH en suero de rata	40
2. Las subregiones que conforman al hipocampo comprenden distintas áreas	40
3. Distribución del ARNm de PPII en el hipocampo de la ratas vehículo y tratadas con T ₃	41
4. Análisis densitométrico de la señal del ARNm de la PPII en el hipocampo de animales vehículos y tratados con T ₃	42
5. Cuantificación de células positivas a PPII en el hipocampo de ratas hipertiroideas	44
6. Cuantificación de células positivas a GAD en el hipocampo de ratas vehículo y tratadas con T ₃	44
7. Distribución del ARNm de GAD en el hipocampo de rata hipertiroidea	45
8. Análisis cuantitativo del número de células que expresan a PPII o GAD en el hipocampo de ratas hipertiroideas	46
9. Análisis densitométrico del número de células que expresan a la PPII o GAD en el hipocampo de ratas hipertiroideas	47
10. Distribución de las células positivas a PPII y GAD en el hipocampo de ratas hipertiroideas, detectada por ensayo de doble hibridación <i>in situ</i>	48
10.1. Distribución en la subregión CA1	48
10.2. Distribución en la subregión CA2	50
10.3. Distribución en la subregión CA3	51
10.4. Distribución en la subregión CA4	53

10.5. Distribución en la subregión del giro dentado.....	54
11. Cuantificación del número de células que coexpresan el ARNm de PPII y GAD en el hipocampo mediante un analizador de imágenes	58
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIÓN	62
PERSPECTIVAS	62
REFERENCIAS	63
ANEXOS	
Anexo 1. Transformación de plásmidos y purificación del ADN	
a) Transformación de <i>E. coli</i> DH5- α con electroporación	68
b) Purificación del ADN de plásmido con Miniprep QIAGEN	68
Anexo 2. Transcripción In vitro con ^{35}S α-UTP	
a) Determinación de la actividad específica del ^{35}S α -UTP	68
b) Determinación del porcentaje de incorporación del nucleótido ^{35}S α -UTP posterior al ensayo de transcripción <i>in vitro</i>	69
Anexo 3. Transcripción In vitro con digoxigenina 11 α-UTP	
a) Detección de la incorporación del 11 α -UTP dig en el ARN transcrito <i>in vitro</i>	70
b) Hidrólisis alcalina de la sonda GAD65 digoxigenina 11 α -UTP por el método de buffer de carbonatos	70
Anexo 4. Preparación de los tejidos para su posterior análisis a nivel celular	
a) Emulsión de los tejidos	71
b) Revelado de la emulsión	71
c) Montaje de los tejidos	72
Anexo 5. Tinciones	
a) Tinción de violeta de cresilo	72

ABREVIATURAS

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNss	Ácido desoxirribonucleico de esperma de salmón
AMPA	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropinólico
ARNc	Acido ribonucleico complementario
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA	Albúmina de suero bovino
CA	Cuerno de Ammon
Cpm's	Cuentas por minuto
CPE	Carboxipeptidasa E
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	Dietil- pirocarbonato
Dig	Digoxigenina
DOI	Densidad óptica integrada
esm	Error estándar de la media
GABA	Acido γ aminobutírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GD	Giro dentado
GnRH	Factor liberador de gonadotropinas
HPT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
HT	Hipotálamo
IPSPs	Potenciales post-sinápticos inhibitorios
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
KDa	Kilodaltones
LTP	Potenciación a largo plazo
MWM	Laberinto de agua de Morris
NMDA	Receptor N-metil D-aspartato
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo

PAM	Peptidil glicil α -monooxigenasa
PC	Convertasa de proteína
PE	Prolil endopeptidasa
PKC	Proteína-cinasa C
POD	Peroxidasa
EPSPs	Potenciales post-sinápticos excitatorios
PPI	Piroglutamil peptidasa I
PPII	Piroglutamil peptidasa II
PPII*	Piroglutamil peptidasa II truncada
PRL	Prolactina
sPSC	Corrientes post-sinápticas espontáneas
RER	Retículo endoplásmico rugoso
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TRH-R	Receptor de la hormona liberadora de tirotrópina
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides o tirotrópina
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
VS	Vesícula de secreción

RESUMEN

En el hipocampo, la hormona liberadora de tirotropina (TRH), un tripeptido, parece regular el estado de alerta, el aprendizaje y la formación de la memoria; estos efectos se atribuyeron a su capacidad para modular la comunicación GABAérgica y glutamatérgica. La piroglutamil peptidasa II (PPII) es una ectoenzima altamente específica para su único sustrato biológico hasta ahora descrito, la TRH. La hidrólisis de TRH por PPII en el medio extracelular del cerebro parece terminar con la actividad del péptido. El hipocampo es una de las regiones con mayor concentración de PPII en el cerebro, pero se desconoce el tipo celular que la expresa, un dato indispensable para entender su papel. Debido a que en el hipocampo la TRH regula la actividad de neuronas GABAérgicas, se postuló que la PPII se expresa en estas neuronas. Para probar esta hipótesis, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* sencilla y doble sobre cortes coronales de cerebro de rata macho adulta Wistar, fijados *in vivo* por perfusión con paraformaldehído. Se utilizaron sondas de RNA antisentido que reconocen el ARNm de la PPII y el ARNm de la enzima de síntesis del GABA, la GAD65. Estas sondas fueron marcadas con ³⁵S y con digoxigenina, respectivamente, y la señal revelada con emulsión fotográfica, o un anticuerpo acoplado a peroxidasa. Se analizó la distribución de las señales en las distintas subregiones del hipocampo y se cuantificaron los números de células marcadas con un analizador de imágenes adaptado a un microscopio óptico.

Los datos mostraron que el ARNm de la PPII se expresa en la mayoría de las subregiones del hipocampo, concentrado sobre la capa de células piramidales, con patrones de expresión diferenciales, igual que lo previamente reportado por Heuer. Se observó que un patrón de distribución de las células GABAérgicas fue consistente con estudios previos. Se observó colocalización del mensajero de la PPII con GAD65 en neuronas del tipo GABAérgico a través de toda la formación hipocampal, siendo más prominente en células piramidales de CA1, CA2 y las capas más profundas del giro dentado. Estos datos sugieren que la eficacia de la TRH para inducir la liberación de GABA por interneuronas hipocampales pudiera ser controlada por la acción de la PPII. Sin embargo, la mayoría de las células PPII positivas no son GABAérgicas, por lo que estamos analizando la opción que sean neuronas piramidales. Estos datos sugieren que la PPII pudiera tener múltiples papeles en la formación hipocampal.

INTRODUCCIÓN

1. Comunicación intercelular en el Sistema Nervioso Central (SNC)

1.1. Comunicación basada en la transmisión de señales sinápticas

La transmisión de señales entre las células del SNC se lleva a cabo en parte a través de la liberación de sustancias como neurotransmisores clásicos (GABA, glutamato, etc.), neuromoduladores (péptidos, lípidos, etc.), proteínas y productos metabólicos. Estas moléculas son sintetizadas por las neuronas y células gliales, y liberadas al medio extracelular de una manera regulada; en el espacio extracelular, son reconocidos de manera específica por receptores en las células blanco, donde ejercen un efecto sobre su actividad eléctrica y bioquímica (figura 1).

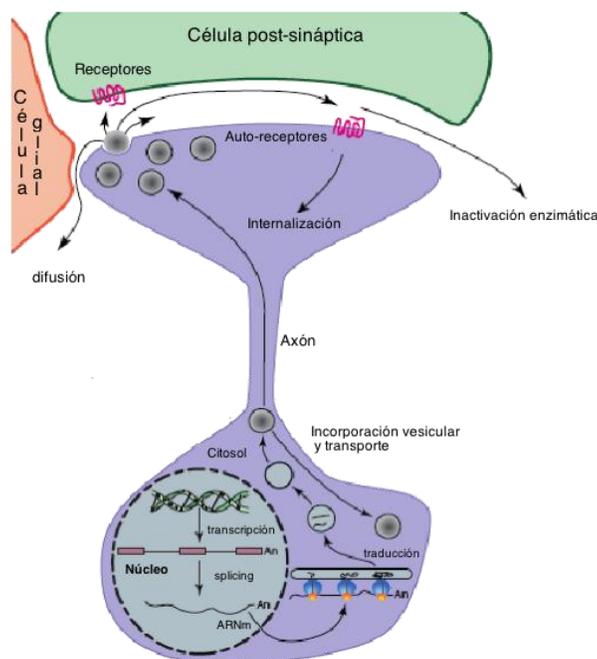


Figura 1. Tipo de comunicación intercelular en el cerebro basada en la transmisión de las señales sinápticas. Las moléculas de señalización como los neuropéptidos, son sintetizados en el soma de neuronas o células gliales, y transportados a través del axón, dentro de vesículas de secreción que se almacenan en la terminal nerviosa hasta recibir la célula un estímulo electroquímico y ser secretadas al medio extracelular; finalmente son reconocidos por las células blanco debido a la presencia de receptores específicos presentes en la membrana plasmática y ejercen su acción.

1.2. Comunicación intercelular basada en la regulación neuroendócrina

Una excepción de la comunicación neural que requiere la liberación de sustancias neuroactivas en una sinápsis es la regulación neuroendócrina. Este tipo de respuesta tiene un papel importante en la homeostasis, el crecimiento, desarrollo, respuesta al estrés, osmoregulación y reproducción, entre otros. Los neuropéptidos que participan en este tipo de regulación neuroendócrina, se sintetizan en el soma de las neuronas peptidérgicas del cerebro en forma de un precursor de alto peso molecular, son procesados y transportados hacia las terminales pre-sinápticas y son liberados al medio extracelular en respuesta a la llegada de trenes

de potenciales de acción; en casos como el de la oxitocina y la vasopresina, al recibirse un estímulo electroquímico, son secretadas directamente a la circulación, a través de la cama de capilares de la neurohipófisis (hipófisis posterior); por otro lado, los neuropéptidos como las hormonas liberadoras (TRH, CRH, etc.), son liberados hacia la adenohipófisis (hipófisis anterior) y estimulan la producción de hormonas (figura 2). Su acción biológica depende de la actividad de sus receptores, los mecanismos para su inactivación y de cómo estos son a su vez regulados. Se distinguen de otras moléculas pequeñas (p.e. óxido nítrico, catecolaminas, etc.) en que no se reciclan o resintetizan en la terminal pre-sináptica.

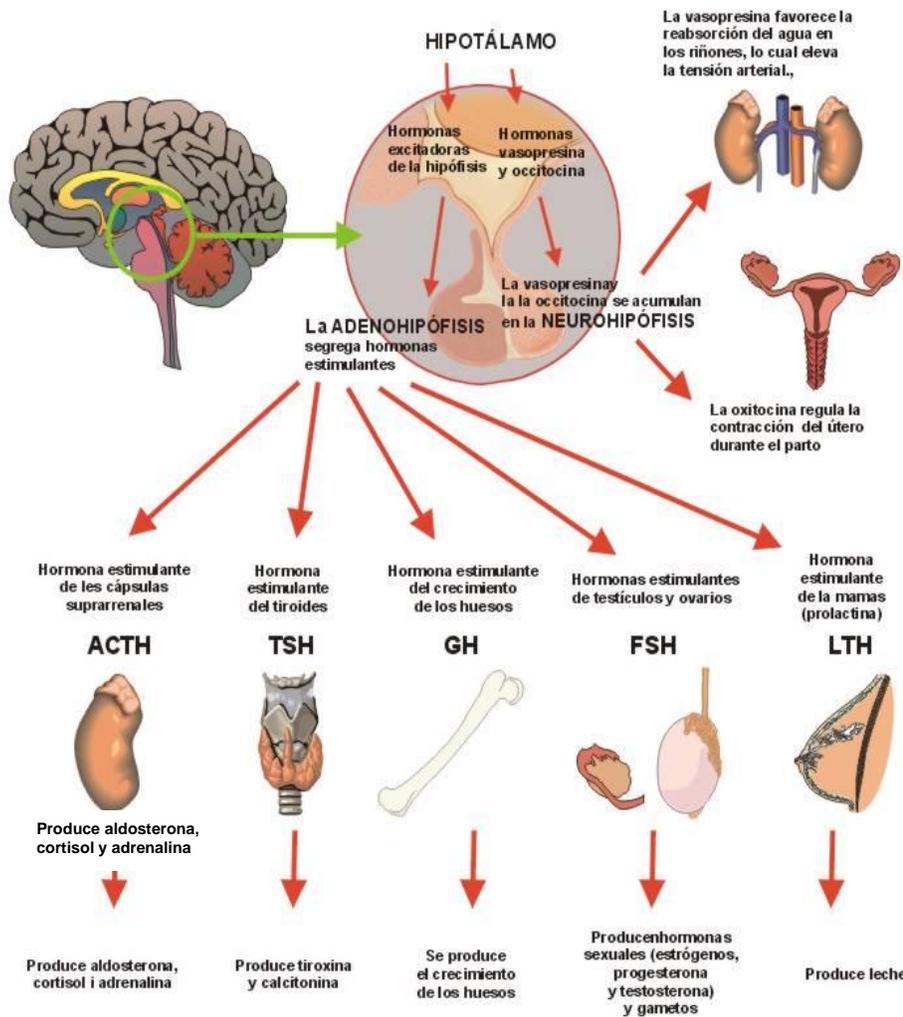


Figura 2. Tipo de comunicación intercelular mediada por la regulación neuroendocrina. Los neuropéptidos son sintetizados y liberados a través de las terminales nerviosas del hipotálamo y la hipófisis; las hormonas liberadoras (CRH, TRH, GnRH, etc.), estimulan la síntesis y difusión de las hormonas estimulantes (ACTH, TSH, GH, etc.) de la adenohipófisis, estas viajan por la circulación sanguínea hasta alcanzar a sus órganos blancos, los cuales expresan receptores específicos.

ANTECEDENTES

1. Hormona liberadora de tirotropina (TRH)

1.1. Características generales

El gen de la TRH fue caracterizado inicialmente en la rata (Lee et al., 1988) y posteriormente en el humano (Yamada et al., 1990). La unidad transcripcional, contiene al promotor 5' de la TRH que incluye varios elementos regulatorios, dos elementos de respuesta al factor de crecimiento epidermal (EGFRE), dos elementos de unión al receptor de hormona tiroidea (TR), 4 elementos de unión al receptor de glucocorticoides (GRE) y dos elementos imperfectos de respuesta a AMPc (CREB's), de los cuáles uno es reconocido por el factor de transcripción AP1. La región codificante del gen consiste de tres exones separados por dos intrones. El exón 1 codifica para la región no traducida del extremo 5', el exón 2 codifica la secuencia del péptido señal y una porción pequeña de la secuencia amino terminal, el exón 3 es el responsable de codificar la mayor parte de la secuencia del pre-pro-TRH (Lee et al., 1988).

En la rata, la TRH se sintetiza a partir de una proteína precursora de alto peso molecular, la pre-pro-TRH, una pro-hormona de 26 KDa, que contiene 5 copias de la secuencia progenitora del péptido (*Gln-His-Pro-Gly*), flanqueadas por pares de aminoácidos básicos (*Lys-Arg* o *Arg-Arg*) y otros 7 péptidos crípticos (con función desconocida). Sin embargo, su amplia distribución en áreas del SNC como bulbo olfatorio, hipocampo, núcleos hipotalámicos, y algunos núcleos del tallo cerebral la relacionan con una función neuromoduladora.

El tripéptido TRH (*pGluHisProNH₂*), funciona como una neurohormona, estimulando la secreción de tirotropina (TSH) y prolactina (PRL) de la adenohipófisis (Boler et al., 1969; Griffiths et al., 1983). Sin embargo, su distribución extra-hipotalámica, su localización a nivel de las sinápsis, su liberación en terminales sinápticas, la unión a sus receptores de alta afinidad en distintas zonas del cerebro, sus efectos específicos sobre la actividad neuronal y la presencia de peptidasas capaces de inactivarlo, proporcionan evidencias que también lo señalan como un neuromodulador.

Se le ha relacionado con una gran variedad de procesos metabólicos, entre ellos la regulación de la termogénesis, la ingesta de agua y comida, el ciclo circadiano y la lactancia, entre otros (Horita et al., 1998; Jaworska et al., 1998; Nillni y Sevarino., 1999; Nillni., 2010). Otros núcleos hipotalámicos que expresan a la TRH son, el área preóptica anterior, lateral, dorsomedial, supra-óptica, periventricular, núcleo supraquiasmático, así como los núcleos dimórfico sexual, medial y lateral del área preóptica.

1.2. Biosíntesis

En el núcleo de las neuronas TRHérgicas, se lleva a cabo la transcripción del ARNm de la TRH que da origen a un precursor biológicamente inactivo (*pre-pro-TRH*), que posee una secuencia de 25 aminoácidos que lo dirigen hacia los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso (RER). Una vez que es translocado hacia el lumen del RER, pierde el péptido señal y adquiere una estructura secundaria específica. Ya como precursor peptídico (*pro-TRH*), viaja dentro de vesículas de la vía secretora hacia el aparato de Golgi, donde sufre

modificaciones post-traduccionales tales como N-glicosilaciones, formación de enlaces disulfuro y el inicio de su procesamiento a péptido maduro.

El precursor peptídico pro-TRH junto con las enzimas encargadas de su maduración, viajan dentro de una VS a la terminal nerviosa. En el trans-Golgi, ocurre la hidrólisis de los enlaces peptídicos adyacentes a los aminoácidos dibásicos que flanquean a cada una de las copias de la TRH por acción de las enzimas convertasas PC1 y PC2 (Friedman et al. 1995). Los ARN's mensajeros de las convertasas están enriquecidos en el tejido neural y endócrino, coexisten en distintas proporciones con el ARNm de la TRH en el NPV, aunque el porcentaje celular que expresa a una o a otra convertasa difiere (Sánchez et al., 1997). Los pares de aminoácidos hidrolizados son removidos por la carboxipeptidasa E (CPE), generando el producto *Gln-His-Pro-Gly*, posteriormente la glicina del extremo C-terminal, es amidada por acción de la enzima peptidil glicil α -monooxigenasa (PAM), y finalmente el residuo glutamina del extremo N-terminal es ciclizado a *piroGlu* por la glutamil-ciclasa (Figura 3).

1.3. Función neuroendócrina

La síntesis de la TRH hipofisiotrópica está confinada a las neuronas del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), que proyectan sus axones hacia la eminencia media del hipotálamo (EM), de donde el péptido es liberado en respuesta a un estímulo neuronal hacia el sistema portal que irriga a la adenohipófisis (AP), aquí estimula la síntesis y liberación de TSH y PRL hacia el torrente sanguíneo, a través del cuál alcanzan a sus órganos blancos, la tiroides y las glándulas mamarias, entre otros. En la tiroides, la TSH activa la liberación de las hormonas tiroideas triiodotironina (T3) y tiroxina (T4), que regulan el gasto energético de todas las células (Arancibia et al., 1983; Boler et al., 1969); por otra parte, en las glándulas mamarias, la secreción de prolactina (PRL), estimulada por la succión de las crías, activa la síntesis del ARNm de la TRH dentro de los primeros 30 minutos, después de ocurrido el estímulo, y eleva la liberación de PRL, la cuál controla la secreción de la leche materna (Uribe et al., 1993).

Las investigaciones del grupo del Dr. Lechan en 1987, mostraron que incrementos en la concentración de las hormonas tiroideas en la adenohipófisis, ejercen un efecto retroalimentador negativo sobre el hipotálamo, inhibiendo la síntesis y liberación de la TRH, así como la síntesis y liberación de TSH de la AP (Figura 4). Consistente con este hallazgo, se demostró que las neuronas TRHérgicas expresan varias isoformas del receptor para hormonas tiroideas (Lechan et al., 1994).

Se ha logrado identificar fibras TRHérgicas en áreas como: la eminencia media, el area preóptica, el núcleo del tracto solitario, el bulbo olfatorio, el séptum lateral, el area amigdaló-hipocámpal, entre otras (Lechan et al., 1982).

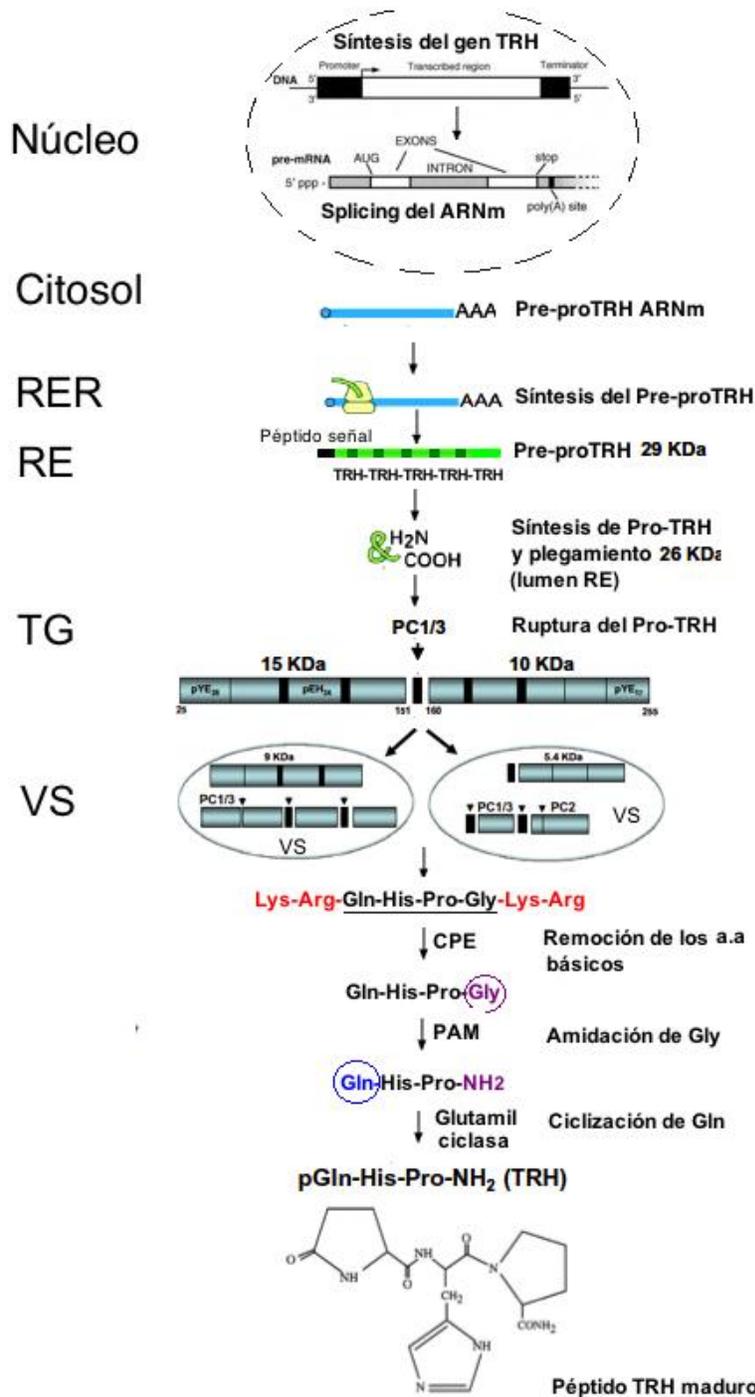


Figura 3. Esquematación del procesamiento de la proteína precursora de la TRH. En el soma de las neuronas TRHérgicas se lleva a cabo la transcripción del ARNm de la pre-proTRH, que viaja fuera del núcleo, y es traducido por los ribosomas del RER para dar lugar a la formación de una proteína precursora de 29 KDa; posee un péptido señal de 25 a.a que la dirige hacia el lumen del RE y le ayuda al translocarse al lumen, donde pierde esta secuencia y adquiere su estructura secundaria (pro-TRH). Viaja a través de la red del TG, pasando por una serie de modificaciones post-traduccionales; recorre todo el axón hasta alcanzar la terminal nerviosa donde una vez maduro es liberado a través de la membrana plasmática al recibir un estímulo electroquímico.

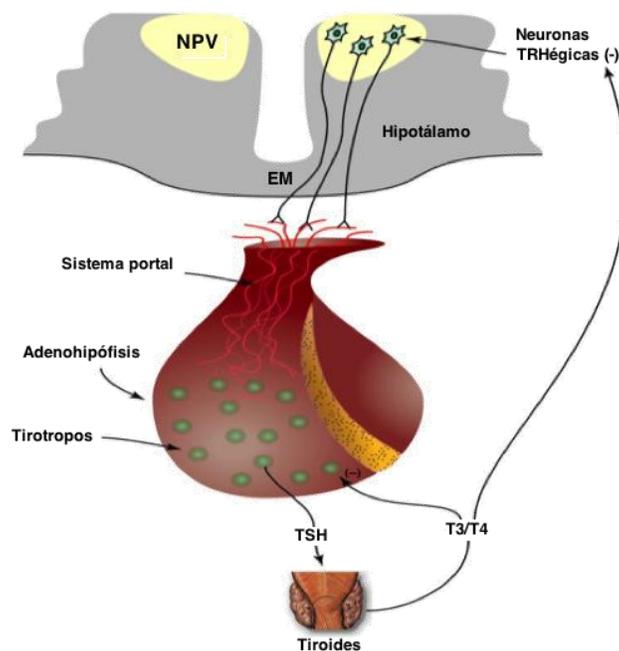


Figura 4. Diagrama del eje hipotálamo-hipófisis- tiroides (HPT). La TRH se sintetiza en las neuronas TRHérgicas del NPV, que a través de sus terminales nerviosas situadas en la EM, liberan al péptido hacia el sistema portal que irriga a la AP, donde se estimula la síntesis y liberación de TSH y PRL. Estas hormona viajan a través de la sangre hasta alcanzar a sus órganos blancos, la tiroides y las glándulas mamarias. En la glándula tiroides, se estimula la síntesis y liberación de las HT (T3/T4), las cuáles ejercen un efecto retroalimentador negativo sobre el eje HPT. En las glándulas mamarias se estimula la producción de leche.

1.4. Función neuromoduladora

Alrededor del 70% de la TRH del cerebro se encuentra en el hipotálamo, sin embargo, presenta una amplia distribución en regiones extra-hipotalámicas, hecho que la ha relacionado con una función neuromoduladora.

El ARNm de la pro-TRH extra-hipotalámica está presente en los núcleos basolateral y posteromedial cortical de la amígdala, el núcleo reticular y la estría terminal del tálamo, así como en la zona granular del giro dentado del hipocampo (figura 5, A1-A3); sin embargo, grandes cantidades del péptido se han obtenido de muestras de corteza frontal, hipocampo, núcleo acumbens, séptum, amígdala, núcleo reticular talámico, tallo cerebral, cerebelo y bulbos olfatorios. Durante las últimas décadas, se han descubierto distintos efectos farmacológicos ejercidos por la TRH en algunas de estas zonas; se sabe, entre otros, de una acción antidepresiva, antiepiléptica, neuroprotectora, analéptica y ansiolítica, además de un papel reconocido en el mejoramiento de la cognición y el incremento de la actividad locomotriz de los animales (Heuer et al., 1998; Charli et al., 1998; Nillni y Sevarino., 1999; Nillni., 2010).

Los receptores que reconocen a la TRH liberada al medio extracelular son TRH-R1 y TRH-R2, se localizan en las células post-sinápticas acoplados a proteínas G. Sus secuencias de aminoácidos presentan un 50% de similitud, ambos se unen de forma similar al péptido y cuentan con características de señalización muy parecidas (Itadani et al., 1988).

Detectado a través de la técnica de hibridación *in situ* en los trabajos de Heuer et al., 2000, el ARNm del TRH-R2, indica niveles de expresión moderados en algunas regiones del tálamo, y muy enriquecidos en el séptum medio, la banda diagonal de Broca y la corteza cerebral (figura 5, C1-C3); sucede lo contrario con la expresión del TRH-R1, la cuál es muy limitada en las regiones extra-hipotalámicas; pocas neuronas con TRH-R1 han sido identificadas en la amígdala, corteza cerebral, estrato radial de la formación hipocampal y el borde de la capa granular del giro dentado (figura 5, B1-B3).

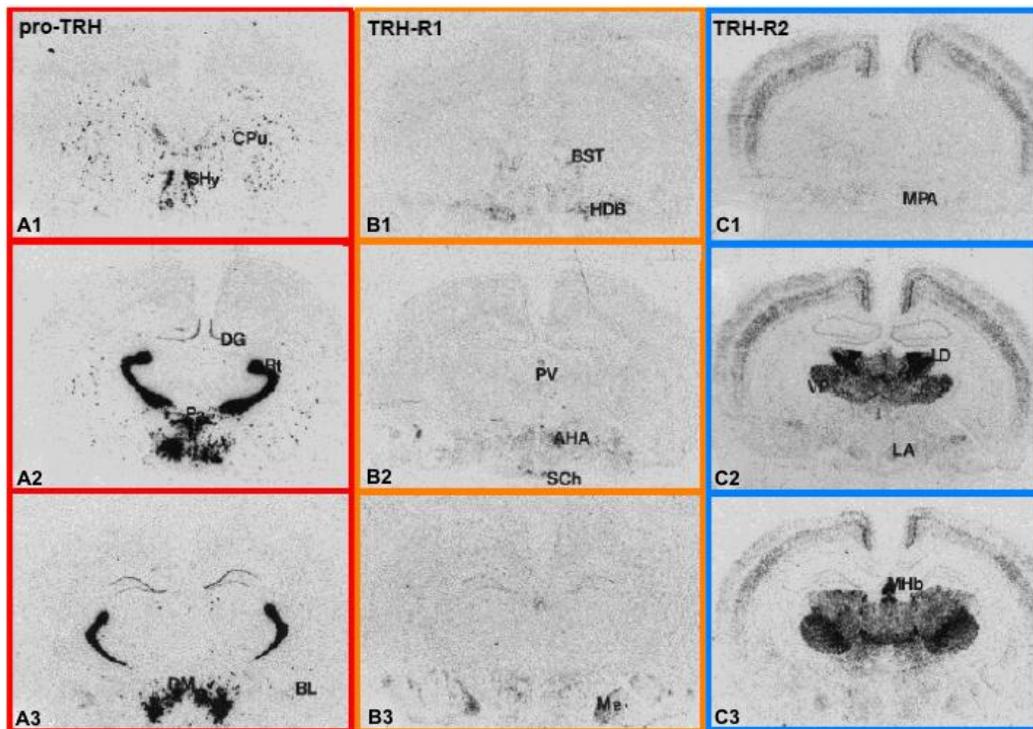


Figura 5. Mapeo de la distribución del ARNm de TRH-R2, TRH-R1 y pro-TRH en cortes coronales del cerebro de rata. A1-A3, ARNm de pro-TRH presente de manera abundante en el hipotálamo, sin embargo, algunas neuronas con señal positivas fueron encontradas en los núcleos basolateral y posteromedial cortical de la amígdala, el núcleo reticular y estría terminal del tálamo, así como la zona granular del giro dentado del hipocampo. B1-B3, el receptor TRH-R1 tiene una distribución extra-hipotalámica muy limitada, se observaron pocas neuronas esparcidas en la amígdala, la corteza y el hipocampo. C1-C3, el receptor TRH-R2, reveló niveles de expresión moderados en el tálamo y muy enriquecidos en el séptum medio y la corteza cerebral. AHA, núcleo anterior hipotalámico; BL, núcleo basolateral de la amígdala; BST, cama nuclear de la estría terminal; CPU, putamen caudal; DG, giro dentado; DM, núcleo dorsomedial hipotalámico; HDB, parte horizontal de la banda diagonal de Broca; LA, núcleo latero-anterior hipotalámico; LD, núcleo dorsolateral talámico; MHb, habénula media; MPA, área preóptica media; PV, núcleo paraventricular talámico; Rt, núcleo reticular talámico; Sch, núcleo supraquiasmático. (Imagen modificada de Heuer et al., 2000).

1.5. Mecanismos de inactivación

Una vez liberado al medio extracelular, en paralelo con su interacción con sus receptores específicos, el péptido de la TRH tiene una vida media muy corta ya que es rápidamente inactivado. Distintos mecanismos han sido propuestos para su eliminación como: difusión, recaptura, modificaciones covalentes e hidrólisis. Este último mecanismo es llevado a cabo por peptidasas, intracelulares como la piroglutamil peptidasa I (PPI)

o la prolil endopeptidasa (PE), que hidrolizan los enlaces entre pGlu-His e His-ProNH₂ de la TRH, respectivamente (O'Leary y O'Connor., 1995); sin embargo, los ensayos *in vitro* han demostrado que las especificidades de ambas enzimas son muy amplias, actuando sobre otros sustratos además de la TRH. Por ejemplo, la PPI hidroliza otros péptidos como bombesina, GnRH y neurotensina (Suen y Wilk., 1989; Cummins y O'Connor., 1998). La PE de igual manera, reconoce a las angiotensinas I y II, la sustancia P, la neurotensina y la GnRH; por lo que la evidencias apunta a que estos mecanismos no son críticos para la inactivación extracelular de la TRH. Existe un mecanismo altamente específico para la degradación de la TRH liberada al medio extracelular, llevado a cabo por la ectoenzima piroglutamil peptidasa II (PPII), y por la tiroliberinasa, una isoforma codificada de la PPII codificada por el mismo, encargada de la degradación de la TRH en sangre.

2. Piroglutamil peptidasa II (PPII)

2.1. Características generales

Inicialmente fué descrita una actividad degradadora de la TRH presente en las membranas sinaptosomales del cerebro (Joseph-Bravo et al., 1979); más tarde se demostró que correspondía a una hidrolasa capaz de romper el enlace entre *pGlu-His* de la TRH, por lo que fué llamada piroglutamil peptidasa II (PPII). A diferencia de la PPI citosólica, esta ectoenzima tiene una especificidad muy estrecha por la TRH, o péptidos estructuralmente análogos a la TRH como *pGlu-Phe-ProNH₂*, un tripéptido que a pesar de no estar presente en el cerebro de rata o humano, ha sido identificado en líquido seminal de humano, y es eficazmente hidrolizado por PPII purificada de cerebro bovino (Gallagher et al., 1998; Kelly et al., 2000). La inhibición de la PPII con CPHNA, incrementa la recuperación de TRH liberada al medio extracelular en rebanadas de cerebro (Charli et al., 1989); evidencia que apoya el involucramiento de esta enzima en la hidrólisis de la TRH de los espacios extracelulares del cerebro. Se propone que la inactivación de la TRH por PPII promueve la remoción eficaz del péptido de los espacios sinápticos, evitando la desensibilización de los receptores por exceso de ligando, dejando lista a la neurona para recibir una nueva señal (Charli et al., 1998).

La PPII es codificada por un solo gen que genera al menos tres especies de ARNm distintas en el cerebro y pituitaria de rata. La enzima en su forma activa, se conforma por dos subunidades idénticas (homodímeros) asociadas de manera no covalente, ancladas en las membranas de células post-sinápticas (Charli et al., 1988). Como se muestra en la representación de la figura 6, la secuencia primaria de la PPII deducida a partir del ADNc de rata, corresponde a una proteína integral de membrana tipo II, de 1025 aminoácidos que posee un pequeño dominio intracelular N-terminal con un potencial sitio de fosforilación por una protein-cinasa C (PKC), un segmento transmembranal de 22 aminoácidos y un dominio extracelular C-terminal muy grande que posee la secuencia consenso *His-Glu-X-X-His* que contiene al sitio activo característico de las peptidasas de zinc de la familia M1 de glucinas, y 12 sitios para N-glicosilaciones (Schauder et al., 1994).

Un evento de *splicing* alternativo del ARNm de la PPII en la frontera entre el exón 14 y el intrón 14, genera una isoforma con el potencial de traducir una proteína truncada (PPII*), carente del dominio C-terminal. La PPII* ha sido detectada en los tejidos que normalmente expresan a la PPII, pero sus niveles de ARNm suelen

ser variables. No presenta actividad hidrolítica al ser expresada en células COS-7, por el contrario, funcionó como una dominante negativa de la PPII, anclándose a la membrana plasmática de las terminales nerviosas en forma de heterodímero (PPII-PPII*); se postula que la existencia de las ectopeptidasas truncadas pudiera ser un nuevo mecanismo de regulación entre peptidasas (Chávez-Gutiérrez et al., 2005).

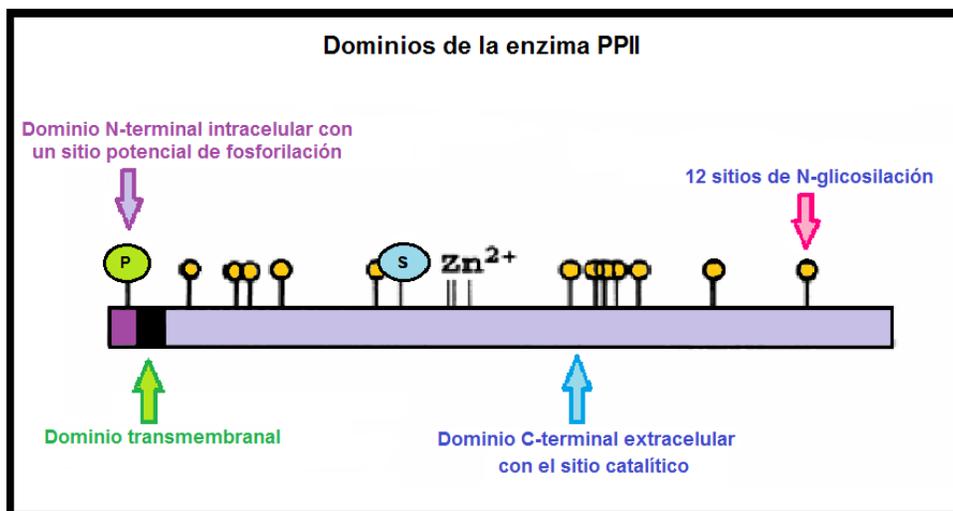


Figura 6. Representación de la topografía de la PPII deducida a partir del ADNc de rata. La ectoenzima en su forma activa se encuentra como un homodímero. Cada uno conformado por tres dominios principales, un dominio intracelular N-terminal muy corto con un sitio potencial de fosforilación; un dominio trans-membranal de 22 aminoácidos y un dominio C-terminal extracelular muy largo, que contiene al sitio catalítico, con un átomo de zinc y 12 sitios consenso para N-glicosilaciones (Imagen modificada de Bauer, K., 1995).

2.2. Distribución del ARNm a través del sistema nervioso central

El ARNm de la PPII presenta una fuerte expresión en regiones como el hipotálamo, la corteza frontal, la corteza piriforme, el séptum lateral, la habénula media, la estria terminal, los núcleos medial y central de la amígdala, el hipocampo, el cerebelo, el tallo cerebral, así como regiones fuera del cerebro como la adenohipófisis y algunos tejidos periféricos. Su expresión en algunas de estas áreas, coincide con la de al menos alguno de los receptores de la TRH (Heuer et al., 2000). Niveles elevados de su actividad enzimática han sido detectados en el hipocampo, la corteza cerebral, el núcleo acumbens, la eminencia media, la adenohipófisis, retina, pulmones e hígado (Vargas et al., datos aún no publicados).

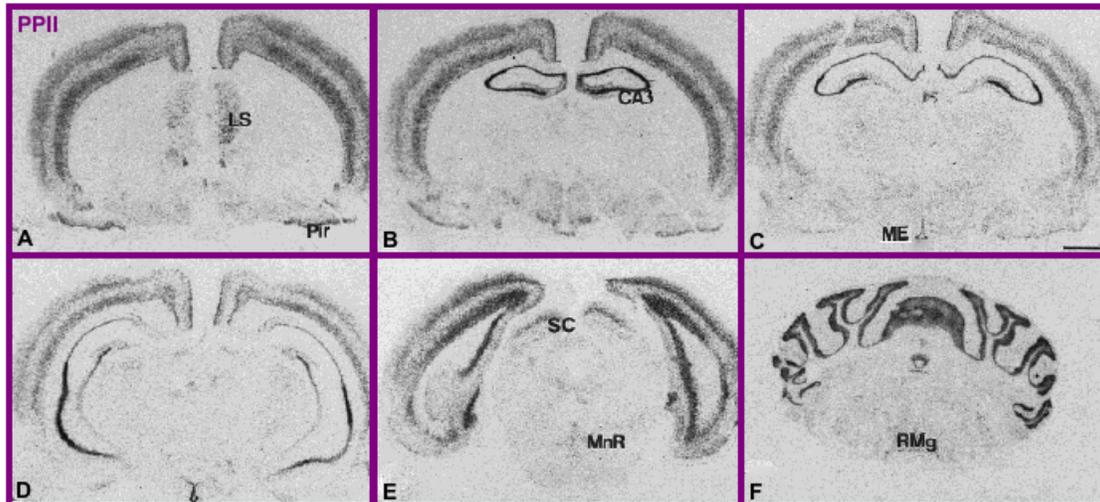


Figura 7. Mapeo de la distribución del ARNm de la ectoenzima PPII en cortes coronales a través del cerebro de rata. A-F, la señal radioactiva del ARNm de la PPII se encuentra en la eminencia media, la corteza frontal, la corteza piriforme, el séptum lateral, el hipocampo, los núcleos medial y central amigdalinos, y el hipotálamo. CA3, región CA3 del cuerno de Amón; LS, séptum lateral; ME, eminencia media; MnR, núcleo rafé medio; Pir, corteza piriforme; RMg, núcleo rmagno-rafé; SC, colículo superior (Imagen modificada de Heuer et al., 2000).

2.3. Regulación del metabolismo de la TRH en la adenohipófisis

Las primeras investigaciones sobre el papel y la regulación de la PPII se centraron en la adenohipofisis por ser una región donde se conoce bien el papel de la TRH. La actividad de la PPII es modulada en esta región por distintas condiciones fisiológicas, entre ellas, el ciclo estral, presentando sus niveles de expresión más bajos en el día 2 del diestro (Uribe et al., 1991). En otro estudio, se demostró que durante el ciclo circadiano de ratas, los niveles del mensajero de la PPII van fluctuando a lo largo del día, siendo más bajos durante la mañana (Vargas et al., 2002). El estado hormonal del organismo, también ejerce un efecto sobre la expresión de la ectoenzima, registrando incrementos *in vivo* de la actividad de la PPII, en ratas hembras ovariectomizadas, que fueron revertidos al hacer un tratamiento con 17- β oestradiol (Bauer., 1988).

Por otro lado, elevaciones en los niveles de hormonas tiroideas en sangre, a la par de la inhibición del eje HPT, promueven incrementos en los niveles del ARNm de la PPII, así como en su actividad enzimática (Ponce et al., 1988; Heuer et al., 1998). Estos datos señalaron inicialmente a la PPII de la adenohipófisis como responsable de la regulación de la secreción de TSH, sin embargo, estudios posteriores *in vitro*, en células adenohipofisiarias de cultivos primarios, demostraron que la PPII se presentó principalmente en células lactotrópicas y no en tirotrópicas; adicionalmente la inhibición de la actividad de la enzima en el cultivo, reflejó incrementos únicamente en la secreción de prolactina en respuesta a la TRH, lo que podría sugerir que en esta región, la PPII contribuye principalmente a la regulación de la secreción de prolactina (Cruz et al., 2008).

2.4. PPII de tanicitos

Estudios recientes demostraron que la PPII se expresa en tanicitos de la pared infralateral del tercer ventrículo, en la extensión rostrocaudal de la eminencia media del hipotálamo, donde a través de asociaciones axo-gliales pudiera estar controlando la cantidad de péptido de la TRH secretado al medio extracelular por terminales axónicas de neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas, y por lo tanto la secreción de tirotropina (figura 8). En estas células, la PPII parece contribuir a la retroalimentación negativa del eje HPT, a causa de incrementos de la hormona tiroidea T_3 , ya que incrementos en los niveles circulantes de esta hormona, regula de manera positiva los niveles de ARNm de la enzima, así como la actividad enzimática en el hipotálamo medio basal (Sanchez et al., 2009).

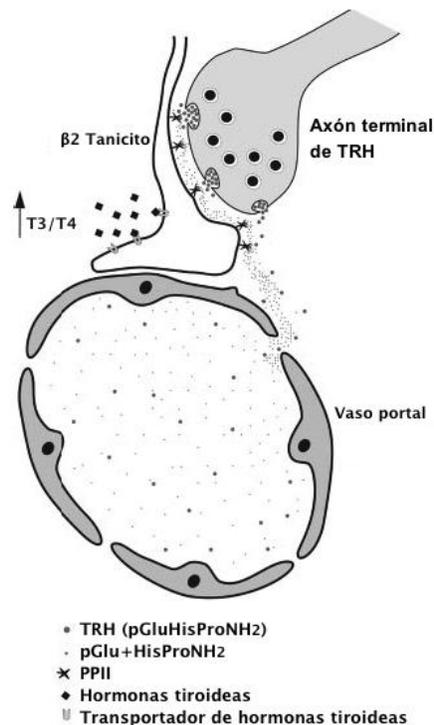


Figura 8. Evidencia *in vivo* de la regulación de la acción de la TRH por la PPII de tanicitos. El esquema integra los datos experimentales que muestran que la PPII de tanicitos de la pared infralateral del tercer ventrículo de la eminencia media, regula la cantidad de TRH que llegará a la adenohipófisis, y por lo tanto controla la secreción de TSH. El aumento en los niveles de hormonas tiroideas circulantes, ejercen un efecto retroalimentador negativo sobre el eje HPT, incrementando la expresión del ARNm de la PPII en el hipotálamo medio basal (Imagen modificada de Sanchez et al., 2009).

A diferencia de lo que sucede en la adenohipofisis y tanicitos de la pared infralateral del tercer ventrículo de la eminencia media, no queda claro si en otras zonas del cerebro, las hormonas tiroideas regulan la actividad o expresión de la PPII; de manera interesante Suen y Wilk., 1989, observaron que la administración crónica de T_3 (10-14 días), elevó significativamente la actividad de la PPII en la corteza frontal y el suero de rata; mientras que en el grupo de Bauer et al., 1990, no observó ningún efecto en las regiones analizadas. En nuestro grupo, una dosis de 20 $\mu\text{g}/100 \text{ g.b.w}$ de T_3 , administrada vía intraperitoneal durante 7 días, detectó un

incremento del 37% sobre el grupo control, en la actividad de la enzima PPII de la adenohipófisis de ratas macho adultas; en otros tejidos analizados como el núcleo arcuato, la eminencia media, resto del hipotálamo, núcleo acumbens-lateral del séptum, así como riñón o pulmón no se detectó algún cambio en la actividad de la PPII (Ponce et al., 1988).

2.5. Regulación a nivel central

La evidencia *in vivo* que señala a la PPII como la encargada de controlar la comunicación mediada por la TRH en el cerebro es todavía escasa. Sin embargo, en el séptum medio, una región donde se ha detectado una elevada actividad de la enzima, se realizaron ensayos de inhibición, en animales sometidos a un tratamiento con etanol que les indujo un estado de narcosis, y se observó un efecto analéptico causado por la inyección intracerebroventricular de TRH, el cuál fue dosis-dependiente. La administración de un inhibidor de la PPII (*pGlu-Asn-Pro-7-amido-4-methylcoumarina*), no tuvo ningún efecto por si solo, pero al inyectarlo junto con TRH el efecto sobre la pérdida de reflejo (LORR) de los animales fue significativo. Estos datos sugieren que en el cerebro, la PPII se expresa en neuronas que responden a TRH. Sumado a estos resultados, se sabe que en esta región, el 35% de la población de neuronas que expresan al ARNm de la PPII, co-expresan el ARNm de TRH-R1, sin que se sepa que tan común es esta colocalización (Lazcano et al., 2012).

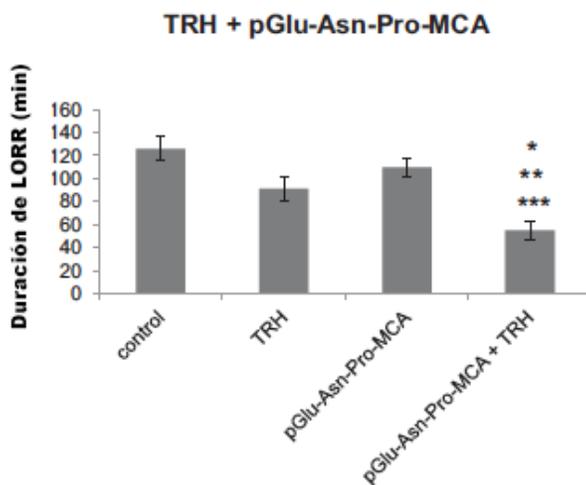


Figura 9. Efecto de la inhibición de la PPII en el séptum medio. Durante la pérdida de reflejo (LORR) en ratas con narcosis inducida por etanol, fue detectada una disminución significativa en la duración de LORR, causada por la inyección de un inhibidor de la PPII (*pGlu-Asn-Pro-7-amido-4-methylcoumarina*), junto con de 5µg de TRH. Los animales que tuvieron una disminución en la duración de LORR, despertaron del sueño inducido por narcosis en un tiempo menor que los animales del grupo control (Lazcano et al., 2012).

3. El Hipocampo

3.1. Proyecciones intrínsecas del circuito hipocampal trisináptico

El hipocampo de la rata está situado en la parte caudal del cerebro (figura 10.A), y se conforma de subregiones citoarquitectónicamente distintas, identificadas como el cuerno de Ammon, subdividido en CA1, CA2, CA3, CA4, y el giro dentado. Proyecciones intrínsecas y unidireccionales transfieren la información recibida del medio externo hacia las subregiones que conforman el circuito hipocampal. Se propone a la corteza entorrinal como la principal fuente de inervaciones axónicas extrínsecas que recibe el hipocampo, sin embargo, también se han identificado aferencias que provienen del fórnix dorsal, la fimbria del hipocampo, la estria supra-callosa, la amígdala y el tálamo (T. Szilágy et al., 2011).

3.2. Cuerno de Ammon

La organización estratificada de las sub-regiones CA1, CA2, CA3 y CA4, consta de la capa de células más profunda llamada estrato lacunosum-molecular, por encima se localiza el estrato radial, la capa de células piramidales y el estrato oriens en la parte más externa (figura 10.B). Sólo CA3 y CA4 poseen estrato lucidum, una delgada zona localizada justo por encima de la capa piramidal, inervada por axones de las fibras musgosas provenientes del giro dentado. Las dendritas apicales (en el estrato radial) y basales (en el estrato oriens) de CA1 reciben entradas de tipo glutamatérgico desde CA3 (T. Szilágy et al., 2011).

3.3. Giro Dentado

El giro dentado, tiene una composición laminada formada por una capa de células apical, llamada la capa molecular; por debajo de esta la capa de células granulares, en la cuál se pueden encontrar tanto neuronas como interneuronas; la capa de células polimórficas; y por ultimo, el hilus en la parte más basal (Amaral et al., 1995, figura 10.B). Dentro de esta subregión, se han identificado proyecciones axónicas de origen glutamatérgico inervando el CA3; estas neuronas son llamadas fibras musgosas y forman parte del circuito hipocampal.

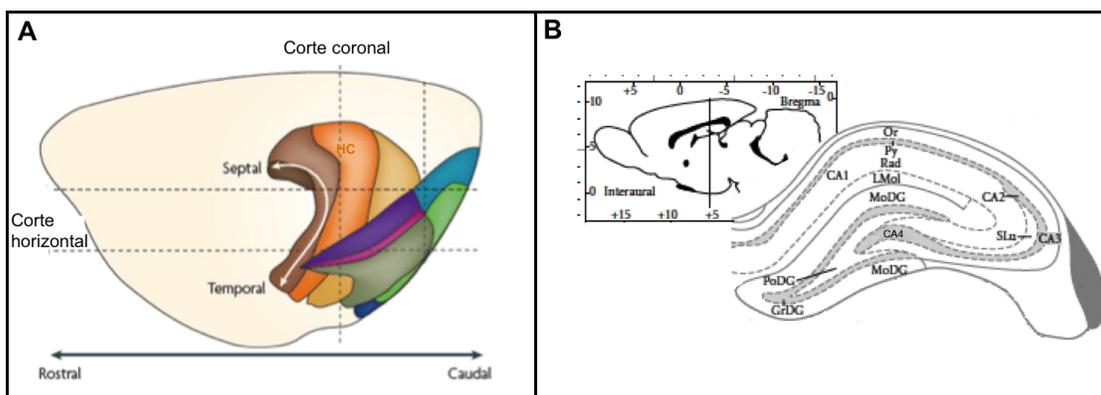


Figura 10. Esquematación del hipocampo de rata y las capas citoarquitectónicas que lo conforman. A. Plano sagital del cerebro que nos muestra la ubicación caudal del hipocampo, las líneas punteadas muestran como se obtienen los cortes coronales y transversales (u horizontales) al rebanar un cerebro. B. Imágenes tomadas de Paxinos, donde se muestra el Bregma de un corte sagital del hipocampo dorsal (dentro del rectángulo al fondo) y un esquema de un corte coronal, donde se señalan las distintas subregiones y capas que conforman al hipocampo. HC, hipocampo; GD, giro dentado; MoDG, capa molecular del giro dentado; GrDG, capa granular del giro dentado; PoDG, capa polimórfica del giro dentado; CA, cuerno de Ammon; Or, estrato oriens; Py, estrato piramidal; Rad, estrato radial; LMol, estrato lacunosum-molecular; Slu: estrato lucidum (Imagen modificada de van Strien et al., 2009); Paxinos y Watson., 5th ed).

4. Efectos de la acción de la TRH en el hipocampo

4.1. Distribución de los elementos involucrados en la comunicación TRHérgica

El hipocampo contiene grandes cantidades de TRH (Low et al., 1989) y expresa a sus receptores específicos (Heuer et al., 2000). El receptor que se expresa en el hipocampo en condiciones basales es el TRH-R1 (figura 11A), mientras que TRH-R2 es abundante únicamente en la pre-comisura hipocampal (Heuer et al., 2000). Las células que expresan al TRH-R1 en el hipocampo, se encuentran dispersas en el estrato radial de CA1 y CA3, sugiriendo que estas células pudieran ser interneuronas de origen GABAérgico. La selectiva localización del ARNm del TRH-R1 en las interneuronas GABAérgicas que forman las sinapsis inhibitorias en las células piramidales del hipocampo, sugiere que la TRH se encuentra regulando la función GABAérgica en el hipocampo (Deng et al., 2006).

La expresión de la PPII en el hipocampo es característica en cada una de las subregiones. En la parte rostral, los niveles de PPII son más prominentes en la subregión CA2, seguida por altos niveles de expresión en CA4, CA3, y niveles ligeramente menores en CA1; en el giro dentado hay baja o casi nula expresión en la capa de células granulares (figura 11.B, Heuer et al., 2000).

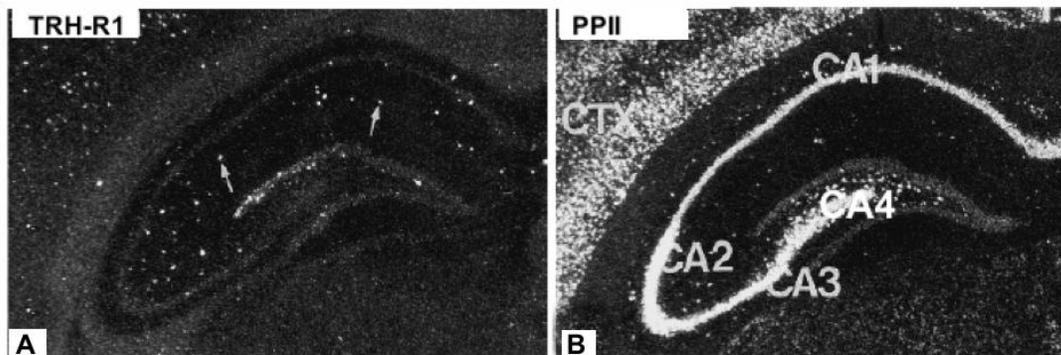


Figura 11. Distribución del ARNm del TRH-R1 y PPII en el hipocampo de rata. A. En el hipocampo el receptor de la TRH que se expresa en condiciones basales es el TRH-R1. En la figura se muestran con flechas neuronas con TRH-R1 esparcidas a través del estrato radial de CA1 y CA3 del hipocampo, sugiriendo que estas son interneuronas GABAérgicas. B. La expresión de la PPII es abundante y diferencial en cada subregión del hipocampo, registrando los mayores niveles en CA2, seguido por CA4, CA3 y CA1; en el GD hay baja o casi nula expresión de la enzima. CA, Cuerno de Ammon; CTX, corteza cerebral (Imagen modificada de Heuer et al., 2000).

4.2. Evidencias que asocian a la TRH con la fisiología del hipocampo

Además de los datos farmacológicos, diversas pruebas experimentales se han empleado exitosamente para correlacionar la actividad de los sistemas TRHérgicos con la fisiología, ya que permiten visualizar *in vivo* la activación de las neuronas de los circuitos TRHérgicos en las zonas límbicas, o la detección del ARNm de la pro-TRH.

El hipocampo está relacionado con una gran variedad de funciones fisiológicas como el estado de alerta, el aprendizaje y la formación de la memoria espacial, entre otras; estas funciones están relacionadas con los efectos adjudicados a la TRH, por esta razón, en esta región se detecta una alta concentración del péptido de TRH en condiciones basales con elevaciones de los niveles del ARNm bajo algún tipo de estimulación fisiológica.

Durante la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto de agua de Morris (Morris- water- maze; MWM), se observó una modulación de los elementos involucrados en la comunicación TRHérgica en el hipocampo, específicamente en CA3 del hipocampo posterior, donde el mensajero de la pro-TRH y del receptor TRH-R1 incrementaron, mientras que los de la PPII disminuyeron; relacionándose la actividad de estas neuronas TRHérgicas con el aprendizaje espacial y la memoria (Aguilar-Valles et al., 2006). Esto coincide con el aumento en el número de botones sinápticos observado en esta región por Ramírez- Amaya et al., 2001.

En el modelo de epilepsia generado por estimulación subumbral repetitiva amigdalina (*kindling* amigdalino), se observó acumulación del péptido de TRH en las terminales nerviosas del giro dentado (GD), hilus, CA2, CA3 y CA4, sugiriendo la existencia de terminales sinápticas en estas zonas; los cambios drásticos observados en la capa granular del GD podrían representar la principal fuente intrínseca de la TRH del circuito hipocampal (Knoblach et al., 1997). Estas observaciones señalan al GD como una región altamente susceptible para recibir señales excitatorias, que podrían causar la liberación indiscriminada de glutamato al medio extracelular. Por esta razón es requerida una liberación oportuna de la TRH.

Un punto interesante que aún es desconocido, es la regulación de los receptores de la TRH en el hipocampo. Los cambios más notables se registraron 6 horas después del establecimiento del *kindling* (etapa V), registrando una disminución de los niveles de ARNm del TRH-R1, mientras que hubo un aumento drástico del mensajero del TRH-R2. Estos incrementos son consistentes con el aumento notable en la síntesis del pro-TRH, en un punto en el que la liberación del péptido pareciera haber sido inhibida, lo que podría sugerir que existe tal exceso de péptido liberado en la hendidura sináptica que genera una falta de receptores libres para capturarlo.

Los incrementos más notables detectados para la actividad enzimática de la PPII durante el *kindling* ocurren en la etapa II, de manera específica en todas las regiones epileptogénicas. Estos cambios son subsecuentes a los cambios en la expresión de su ARNm (de Gortari et al., 1995, 2005). La figura 12, resume algunos de los resultados más importantes sobre la regulación del metabolismo de la TRH en el hipocampo.

Modulación de los elementos involucrados en el circuito TRHérgico en el hipocampo						
Tipo de prueba	Estrategia		Pro-TRH	TRH-R1	TRH-R2	PPII
Invasiva	Kindling	Nivel II	↑	↓	↑	↑
		Nivel V	↑	↓	↑	↓
No invasiva	Morris-water maze	HC anterior	↑	↓	↓	↑
		HC posterior	↑	↑	↑	↓

Figura 12. Tabla que resume la modulación de los elementos involucrados en la comunicación TRHérgica generada por distintos estímulos fisiológicos en el hipocampo de la rata adulta. Durante la pruebas de *kindling*, clasificada como una estimulación de tipo invasiva, ocurre una elevación drástica en los niveles del ARNm de la pro-TRH y de TRH-R2, mientras que los de la enzima PPII se mantienen elevados sólo en las primeras etapas de la prueba (nivel II) y disminuyen al quedar establecido el *kindling* en el nivel V, lo cuál coincide con una inhibición de la liberación del péptido de la TRH de las terminales sinápticas. En la prueba de aprendizaje espacial, el laberinto de agua de Morris (MWM), los cambios más significativos ocurrieron en el hipocampo posterior, registrando incrementos en el ARNm de la pro-TRH, así como de los receptores TRH-R1 y TRH-R2.

4.3. Ensayos electrofisiológicos que relacionan a la TRH con la transmisión GABAérgica

Los efectos neuromoduladores de la TRH en el hipocampo se asocian a modificaciones de la comunicación sináptica clásica. Con la finalidad de conocer algunas las funciones de la TRH en el hipocampo, se han intensificado los estudios sobre la liberación del GABA mediada por la TRH; en los registros electrofisiológicos obtenidos a través *patch-clamp* por Stocca y Nistri., 1996, incrementos en la frecuencia de las corrientes post-sinápticas espontáneas (sPSC), mediadas por el receptor GABA-A, en las neuronas piramidales del CA1 y en las interneuronas del estrato lacunosum-molecular, se detectaron después de 30 a 60 segundos de la administración exógena de 10 μM de TRH y de bloqueadores de receptores NMDA y AMPA (que también reconocen GABA) en la solución que baña las preparaciones hipocampales. Sin embargo, parece no ejercer los mismos efectos sobre los potenciales post-sinápticos miniatura o evocados (inducidos por estimulación eléctrica).

También se observó que este mecanismo es controlado por un grupo de interneuronas pre-sinápticas que pertenecen a un circuito GABAérgico local, que se comunica exclusivamente con las células piramidales en CA1 y las interneuronas del estrato lacunosum-molecular. Ya que al realizar las mismas pruebas en rebanadas hipocampales que carecían de las subregiones del GD, CA3 o ambas, se obtuvo la misma respuesta. El registro a la par de una célula piramidal y de una interneurona del lacunosum-molecular, apoyó la existencia de una simultaneidad en los eventos de sPSC en estas células, cuya frecuencia incrementa drásticamente después del tratamiento con la TRH, sugiriendo una entrada sensible en común.

En otro ensayo, la aplicación de 0.5 μM de péptido TRH en interneuronas del estrato radial de CA1, indujo un incremento en la frecuencia de los disparos de los potenciales de acción, favoreciendo la liberación de GABA,

al inhibirse la conductancia de K^+ de las membranas en reposo, que generó incrementos en la excitabilidad y liberación del GABA; también fueron observados incrementos en la frecuencia de las corrientes inhibitorias post-sinápticas (sIPSC) en las células piramidales de CA1, CA3 y granulares del GD. Estos resultados, demostraron por primera vez, que este mecanismo de acción de la TRH, inhibe la actividad de los ataques espontáneos provocados por la falta de Mg^{2+} en la solución extracelular de las preparaciones hipocampales, lo cuál es consistente con las evidencias previamente generadas mediante las pruebas del *kindling* amigdalino (Knoblach et al., 1997; de Gortari et al., 2000, 2005).

Ayudando las evidencias de la modulación en la transmisión GABAérgica del hipocampo regulada por la TRH; nuestro grupo comprobó que la aplicación del péptido causa una disminución en la frecuencia de los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs) registrados en las células piramidales de CA3, previniendo el aumento de la excitabilidad eléctrica de estas células ante la aplicación intensa y repetida de estimulación eléctrica (Patiño et al., datos no publicados).

5. Ácido γ - aminobutírico (GABA)

5.1. Características generales

El GABA es el principal mediador inhibitorio de la neurotransmisión en el SNC de los mamíferos y uno de los neurotransmisores más abundantes en el hipocampo. Es sintetizado por las neuronas GABAérgicas, y está involucrado en una gran variedad de funciones cerebrales como el aprendizaje, la memoria, la actividad locomotora, la reproducción, los ritmos circadianos, la ingesta de alimentos, la homeostasis energética y la secreción de las hormonas tiroideas, entre otras.

5.2. Biosíntesis

Su biosíntesis ocurre en vesículas de secreción a partir de L-glutámico, a través de una reacción de descarboxilación llevada a cabo por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), usando piridoxal fosfato como molécula cofactora. Existen dos isoformas de la enzima GAD en el cerebro de rata, las cuáles son codificadas por distintos genes; cada una de ellas presenta un peso molecular de 65 y 67 Kda, por lo que son conocidas como GAD65 y GAD67, respectivamente (Erlander y Tobin., 1991; Erlander, M. G et al., 1991). Se ha sugerido que GAD67 existe predominantemente en forma de holoenzima, por lo que es capaz de sintetizar a GABA inmediatamente, señalándola como la isoforma responsable de mantener los niveles basales del neurotransmisor en las neuronas GABAérgicas. Por otro lado, GAD65 se encuentra preferentemente en forma de apoenzima, sugiriendo que podría estar funcionando como un reservorio de enzima inactiva, que en respuesta a un incremento en la demanda del GABA podría volverse activa (Esclapez et al., 1993). Un ensayo de hibridación *in situ* realizado por Esclapez et al., 1993, confirmó la presencia del ARNm de ambas enzimas dentro de los cuerpos celulares y terminales axónicas de una misma neurona, sin embargo, los niveles de expresión entre una forma y otra, pueden variar. La presencia de ambas enzimas en una misma neurona, en algunas regiones del SNC, sugiere que ambas isoformas son requeridas en la síntesis del neurotransmisor (Esclapez et al., 1994; Kaufman et al., 1991).

5.2. Distribución de la enzima GAD en el hipocampo

GAD65 y GAD67, fueron localizadas en el hipocampo de la rata mediante la técnica de hibridación *in situ* no radioactiva, con sondas de ARNc marcadas con digoxigenina, determinando que la distribución de las células positivas para cada una de las sondas utilizadas en el estudio fue muy similar (figura 13). La prominente presencia de ambas enzimas en el hipocampo, sugiere la necesidad de un sistema dual para la síntesis óptima del GABA en esta región (Houser et al., 1994).

El ARNm de ambas enzimas fue detectado a través de todas las subregiones del hipocampo, mostrando una expresión diferencial entre una y otra, así como entre las capas laminares de una misma subregión. Por ejemplo, en el giro dentado, el mayor número de células GAD se distribuyen hacia las partes más profundas de la capa de células polimórficas y el hilus; dentro de CA3, la cantidad de células GAD fue mayor hacia las zonas más externas de la capa piramidal; en CA1, se encontraron distribuidas principalmente en el estrato piramidal y de manera más moderada en el estrato oriens, así como en la zona intermedia entre el estrato radial y el lacunosum-molecular (Houser et al., 1994).

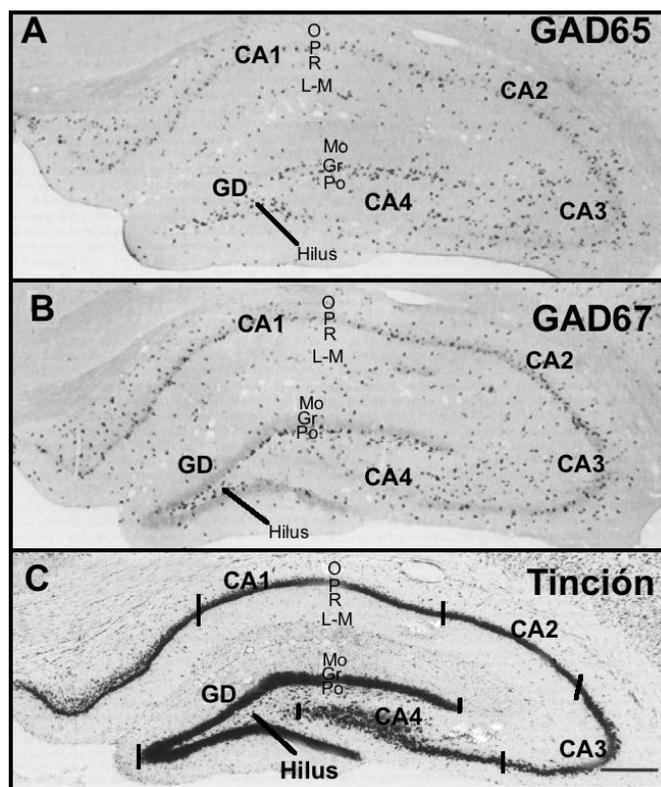


Figura 13. Distribución del ARNm de las dos isoformas de GAD en el hipocampo de rata macho adulta. Ambas isoformas están presentes en los cuerpos celulares y terminales axónicas de las neuronas GABAérgicas en el hipocampo, por lo que su expresión es muy similar; las células que fueron positivas a GAD están distribuidas a lo largo de todas las subregiones hipocámpales, sin embargo, entre una región y otra, así como entre las laminas de una misma subregión, se observan diferencias en el número de células positivas. A. Distribución del ARNm de GAD65. B. Distribución del ARNm de GAD67. C. Tinción con violeta de cresilo del hipocampo. Gr, capa de células granulares; L-M, estrato lacunosum-molecular; Mo, capa de células moleculares; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; Po, capa de células polimórficas; R, estrato radial (Imagen modificada de Houser et al., 1994).

5.3. Tipos de interneuronas GABAérgicas del hipocampo

La relativamente homogénea población de células piramidales del hipocampo, se encuentran interactuando con una muy heterogénea población de interneuronas GABAérgicas. Las cuales proveen no solo inhibición general, sino también, regulan la precisa sincronización de la actividad de las neuronas piramidales.

La localización estratégica de las sinapsis de tipo inhibitorio, indica que las interneuronas GABAérgicas tienen distintas funciones dentro del circuito hipocampal. Estas se pueden clasificar según el sitio que inervan en la superficie de las células blanco.

- **Células axo-axónicas**, proveen sinápsis GABAérgicas exclusivamente en la parte inicial del axón de las células piramidales. Los botones sinápticos de este tipo de células, normalmente están alineados en una sola rama pre-sináptica, produciendo un axón terminal muy característico gracias al cual son comúnmente conocidas como células candelabro (*chandelier cells*). Sus dendritas se pueden extender hacia el estrato oriens, radiatum y lacunosum-molecular.
- **Células en canasta (de basket)**, proveen sinápsis GABAérgicas en el soma y dendritas proximales de las células piramidales y de otras células en canasta. Su axón terminal puede estar confinado a la capa piramidal o extenderse hacia los estratos radial y oriens.
- **Células bi-estratificadas**, las proyecciones de los axón de estas células se dirigen al estrato radial y oriens, evitando usualmente entrar en la capa piramidal, por lo cuál se dice que actúan solamente sobre dominios dendríticos. Como su nombre lo indica, la localización de las dendritas de estas células es bi-estratificada, por lo que se pueden identificar en el estrato oriens y radial.
- **Las células O-LM** tienen el soma y sus dendritas dispuestos de manera horizontal en el estrato oriens, su axón es largo y llega al estrato lacunosum-molecular, donde inerva las dendritas más distales de las células piramidales y de otras interneuronas (T. Szilágy et al., 2011).

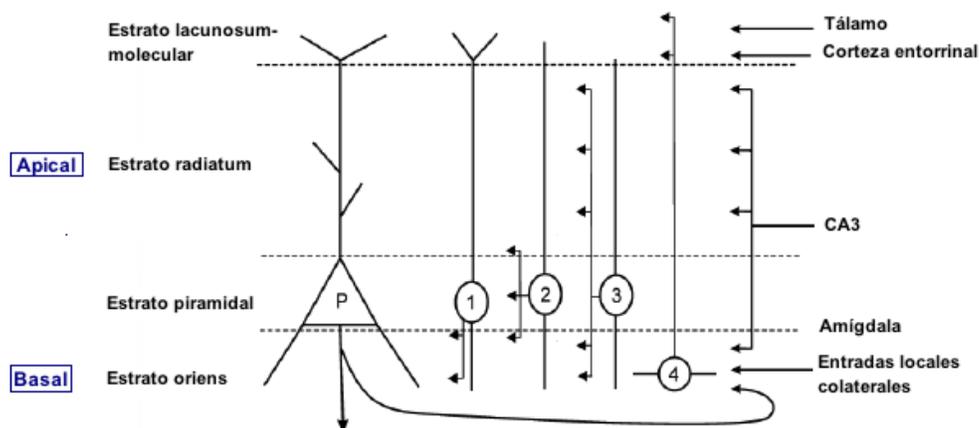


Figura 14. Proyecciones que reciben las células piramidales de CA1. La información que reciben las células piramidales de CA3 proviene de distintas entradas, por CA3 a través de las proyecciones que forman parte del circuito hipocámpal; de proyecciones extrínsecas de la corteza entorrinal, el tálamo y la amígdala. Las señales que reciben estas células piramidales son reguladas por los contactos inhibitorios que reciben de los distintos tipos de interneuronas del hipocampo. 1. Células axo-axonales; 2. Células de basket; 3. Células bi-estratificadas; 4. Células O-LM (Imagen modificada de de T. Szilágy et a., 2011).

JUSTIFICACION

Las funciones de las ectopeptidasas han sido estudiadas por casi 30 años. Estas enzimas juegan un papel fundamental para la eliminación de neuropéptidos en el medio extracelular del cerebro, sin embargo, es evidente que se entiende todavía poco la relación entre la localización de las ectopeptidasas y su impacto fisiológico, tal como fue ejemplificado en el caso de la PPII para el control de la secreción de tirotropina. No queda claro si las ectopeptidasas están concentradas a proximidad de los sitios de liberación de los péptidos, a proximidad de los sitios de acción, o en algún otro arreglo. Debido a que la PPII es una enzima que probablemente tiene un solo sustrato *in vivo*, parece más fácil relacionar su localización con su función que en el caso de otras ectopeptidasas de especificidad amplia, que hidrolizan múltiples péptidos y cuyo impacto funcional puede ser muy diverso. El hipocampo parece un sitio idóneo para estudiar la relación entre la localización y el papel de la PPII ya que en esta formación la PPII tiene una expresión alta; el circuito hipocampal tiene una estructura y una fisiología relativamente bien entendida, y se han caracterizado efectos electrofisiológicos de la TRH. Por lo tanto, se propone profundizar el conocimiento sobre la localización y el papel de la PPII en el hipocampo para entender mejor los mecanismos fundamentales implicados en el catabolismo extracelular de este péptido. Una estrategia que nos acerca a la dilucidación de este entendimiento es realizar estudios de la co-localización de nuestra enzima de interés con elementos del sistema nervioso central bien descritos con anterioridad, como precursores de neurotransmisores de los cuáles se conozca su función y la distribución de su ARNm, como es el caso de la descarboxilasas del ácido glutámico GAD 65, enzima requerida para la síntesis del ácido γ -aminobutírico (GABA). El hecho de que esta enzima esté co-expresándose en la misma célula que la PPII, nos ofrece información nueva muy importante, ya que nos sugiere una relación directa con la distribución de las neuronas GABAérgicas del circuito hipocampal. Debido a que en el hipocampo uno de los efectos del TRH es la estimulación de la liberación de GABA.

HIPÓTESIS

Tenemos datos preliminares que sugieren que células que expresan al péptido CRH expresan también a la PPII (Trujillo y Uribe, no publicado) y que las neuronas CRHérgicas son interneuronas GABAérgicas, por lo que postulamos que la PPII pudiera expresarse en neuronas GABAérgicas.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar que células que en el hipocampo expresan a la PPII en ratas macho adultas.

PARTICULAR

Determinar si la población hipocampal GABAérgica expresa a la PPII y que porcentaje podrían expresarla.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El enfoque metodológico principal del proyecto se centró en la detección y cuantificación de ARN's mensajeros por hibridación *in situ*, en rebanadas coronales de 18 micras de grosor del hipocampo de rata macho adulta.

Para facilitar la detección del ARNm de la PPII, cuyos niveles son escasos en algunas áreas del hipocampo (p.e. el giro dentado), se realizó un tratamiento con hormona tiroidea, triiodotironina T₃. Posteriormente, fue analizado por hibridación *in situ* sencilla usando una sonda radioactiva por ser un método de alta sensibilidad.

Se optimizaron las condiciones para la detección del ARNm de GAD65 empleando una sonda acoplada a digoxigenina.

Una vez optimizadas las hibridaciones *in situ* sencillas para cada gen, se determinó si el ARNm de la PPII co-expresaba en las poblaciones GABAérgicas del hipocampo mediante ensayos de doble hibridación *in situ*.

Por último se comparó la señal de la PPII entre animales controles y tratados con T₃, y se contaron las células GABAérgicas que co-expresaron a la PPII en cada una de las subregiones del hipocampo dorsal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material y H₂O

El material de vidrio que se utilizó para preparar y almacenar las soluciones se horneó a 200°C durante 12 horas. El material que no pudo ser horneado por ser sensible a las altas temperaturas fue esterilizado en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 minutos. Para preparar todas las soluciones de la hibridación *in situ* (ISH) y resuspender los plásmidos o sondas de ARNc se utilizó H₂O desionizada miliQ (calidad: 18M Ω /cm) colectada en frascos horneados, y fué esterilizada en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 minutos, este tipo de H₂O es referida como H₂O-ISH. Todas las soluciones usadas en estos protocolos fueron filtradas (filtros de 0.22 μ m) y autoclaveadas antes de utilizarse.

2. Animales

Se emplearon 20 ratas machos Wistar adultas de 250-350 g. de peso, mantenidas en condiciones controladas de luz-oscuridad (de 7 a 19 hrs) y alimentadas *ad libitum*.

2.1. Tratamiento de animales con hormona tiroidea, 3, 5, 3´ triiodotironina (T₃)

Se empleó un primer lote de 8 ratas para la realización del ensayo de hibridación *in situ* sencilla marcando únicamente el ARNm de la PPII. Se formaron dos grupos, el primer de ellos (n=4) estuvo conformado por ratas a las cuales se les administró diariamente una dosis de 10 μ g de hormona tiroidea T₃, disuelta en 200 μ l de solución salina/ 0.01M NaOH durante 1 semana (el NaOH se usó para facilitar la dilución de la T₃). El resto de los animales (n=4) formaron el grupo vehículo, y fueron diariamente inyectadas con 200 μ l de solución salina/ 0.01 N NaOH, durante 1 semana (se le agregó NaOH a la solución salina para que estuvieran en las mismas condiciones que los animales del grupo tratado). Un segundo lote con 12 ratas fue requerido para llevar a cabo los ensayos de doble hibridación *in situ*, para la detección de los ARN's mensajeros de la PPII y GAD65; los animales de este segundo lote se dividieron en tres grupos; el grupo control (n=4), mantenido intacto hasta el momento del sacrificio, el segundo de animales hipertiroideos (n=4), tratado por 5 días con dosis de 10 μ g de T₃, diluida en 200 μ l de solución salina/ 0.01 N NaOH, y el grupo de vehículos (n=4), que recibió diariamente una inyección de 200 μ l de solución salina/ 0.01 N NaOH, durante 1 semana. El sacrificio de todos los animales se llevó a cabo 6 horas después de la administración de la última dosis de T₃ o solución vehículo.

2.2. Obtención de cerebros por el método de perfusión cardiaca y congelamiento

Los animales recibieron vía intraperitoneal una sobredosis de pentobarbital (63 mg/ml, marca Pet's pharma), y fueron perfundidos haciendo pasar a través de la arteria aorta 20 ml de PBS 0.01M pH 7.4, que contenían 15,000 U/lit de heparina-sulfato (marca Inhepar. Solución inyectable 5,000 U/ml), seguido de la administración

de 150 ml de paraformaldehído al 4% en PBS 0.01M pH 7.4.

Los cerebros fueron disectados y fijados individualmente en frascos que contenían 20 ml de paraformaldehído al 4% en PBS 0.01M pH 7.4 y se mantuvieron a 4°C durante 12 horas (4 horas mínimo). Para su criopreservación, fueron inmersos en 20 ml de una solución de sacarosa al 20% en PBS 0.01M pH 7.4 por 12 horas a 4°C. Los cerebros fueron congelados en hielo seco pulverizado, envueltos en parafilm y almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

2.3. Procesamiento de los cerebros

En un criostato con temperatura de 15°C dentro de la cámara, se realizaron cortes coronales de 18 µm de grosor a nivel del hipocampo dorsal (Bregma entre -2.8 y -3.8) de cerebros de ratas macho adultas. Los cortes fueron colectados de manera consecutiva en PBS 0.01M pH 7.4 con la ayuda de un pincel previamente desinfectado y tratado con RNAsa Zap (marca Ambion The RNA company); posteriormente los tejidos fueron adheridos a portaobjetos (marca Fisher Scientific) y colocados en un disecador a una temperatura de 42°C durante 12 horas (para secar los tejidos y eliminar burbújas) antes de almacenarse a -70°C.

3. Radioinmunoensayo de tirotropina (TSH) en suero de rata

La medición de la TSH en suero se realizó por radioinmunoensayo en muestras experimentales y controles por triplicado. Para la obtención de la curva estándar se añadieron las siguientes cantidades de TSH: 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 y 4000 pg en 200 µl de *buffer* de RIA (*buffer* fosfatos 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, BSA 1%, EDTA 50 mM) y se agregaron 100 µl de antisuero α-TSH (1:375,000). Se tomaron varios volúmenes de las muestras de suero de rata a analizar (25, 50 y 100 µl) que se llevaron a un volumen final de 200 µl con *buffer* de RIA y se les añadieron 100 µl de antisuero α-TSH (1:375,000). Se incubaron las muestras por 24 horas a temperatura ambiente (T°A) y se agregó a cada uno de los tubos 100 µl de *buffer* de RIA con 10,000 cpm's de ¹²⁵I-TSH. Después de incubar nuevamente por 24 horas a T°A, se adicionó a todos los tubos 100 µl de inmunoglobulina de conejo (1:40) en PBS (*buffer* fosfatos 50 mM pH 7.5, 150 mM NaCl). Se agregó a cada tubo 100 µl de suero normal de conejo al 2% en PBS, y se dejó incubando a T°A por 2 horas antes de adicionar 1 ml de polietilenglicol al 4% en PBS para inducir la precipitación del complejo anticuerpo secundario - anticuerpo primario.

El precipitado se recuperó por centrifugación a 5,000 rpm's durante 30 min, se aspiró el sobrenadante y se determinó la radioactividad en un contador de emisiones gama (γ). Finalmente se calculó la cantidad de pg de TSH presentes en cada suero por comparación con la curva estándar.

4. Purificación y linearización de los plásmidos

Los plásmidos utilizados en los ensayos de hibridación *in situ* fueron previamente clonados y el ADN purificado de acuerdo al protocolo de QIAGEN (Ver anexo 1).

Se linearizaron 20µg de cada plásmido durante aproximadamente 4 horas a 37°C. Para PPII se usaron 20 unidades de la enzima de restricción EcoR1 (marca New England Biolabs Inc. 20,000 U/ml) en 10 µl de *buffer* NE1 10X y H₂O-ISH para completar un volumen final de 100 µl. Para GAD65 se usaron 20 unidades de la enzima de restricción XbaI (New England Biolabs Inc. 20,000U/ml) en 10 µl de *buffer* NE4 10X y H₂O-ISH hasta completar un volumen final de 100 µl. Para verificar la linearización total de los plásmidos se corrió un gel de agarosa al 1% (Figura 16).

La purificación del ADN linearizado se llevó a cabo mediante extracción 1:1 (v/v) de fenol: cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), recuperación del sobrenadante por centrifugación rápida de 5 min a 7,000 rpm´s a Tª, 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), recuperación del sobrenadante por centrifugación rápida de 5 minutos a 7,000 rpm´s a Tª, adición de 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 2 volúmenes de etanol absoluto frío, precipitación de 12 horas a -20°C, recuperación del precipitado por centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm´s a 4°C, aspiración del sobrenadante, lavado del precipitado con ½ volumen de etanol al 75% por 5 min a 4°C y 10 minutos de secado a Tª. Finalmente los plásmidos fueron resuspendidos en 20 µl de H₂O-ISH. Su concentración final se determinó por cuantificación en un nanodrop a 260 nm y se corrió 1µg de la muestra en un gel de agarosa al 1% para confirmar la calidad del ADN.

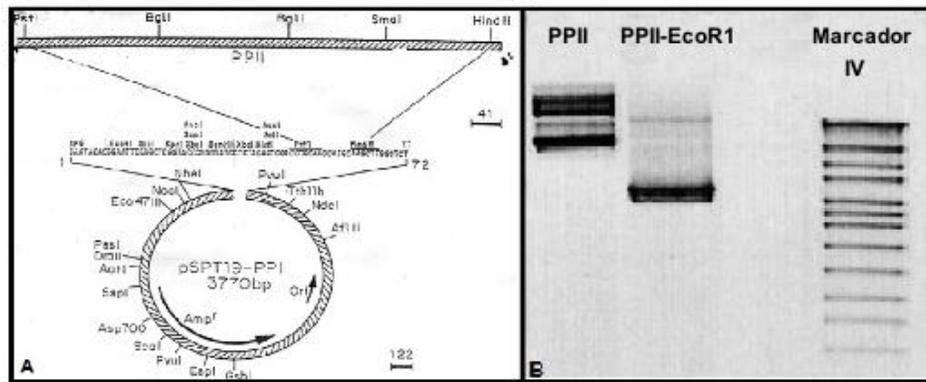


Figura 16. Plásmido de PPII. A. Mapa del plásmido pSPT19-PPII que tiene insertada una parte de la secuencia del cDNA del gen PPII de rata y presenta sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción. B. Análisis electroforético de 1µg del plásmido de PPII sin digerir, linearizado con EcoR1 por 4 horas y 0.5 µg de marcador de peso molecular IV (0.07-19.3 kpb).

5. Marcaje de las sondas

5.1. Transcripción *in vitro* de la sonda PPII con ³⁵S α-UTP

Después de secar 125 µCi de uridin 5' trifosfato, ³⁵S (NEC 039H; actividad específica de 1250 Ci/mmol al empaque), durante 10 minutos en un evaporador de muestras (Savant). En un tubo limpio se prepararon 10.2 µl de la mezcla de transcripción que contenía: (0.7 µl de H₂O-ISH, 1.2 µl de *buffer* de transcripción 10X, 1.2 µl de DTT 0.1M, 2.4 µl de mezcla de nucleótidos A,G,C (2.5 mM), 2.8 µl de r-UTP 10 µM frío y 0.7 µl de inhibidor

de ARNasas (40 U/μl), la marca que contiene el isótopo radioactivo previamente evaporada en el savant, fue resuspendida en 4.5 μl de la mezcla de transcripción, se le adicionó 1 μg de plásmido pSPT19-PPII linearizado (previamente desnaturalizado por 3 min a 65°C e inmediatamente colocado en hielo) y 1 μl de ARN polimerasa T7 (marca New England Biolabs Inc. 5,000 u/ml). La reacción se dejó por 1 hora a 37°C, al termino del tiempo se adicionó nuevamente 1 μl de ARN polimerasa T7 y se dejó incubando a 37°C por 1 hora, finalmente se adicionaron 1μl de ARNt 10mg/ml, 1 μl de ADNasa I (10 U/μl) y 1 μl de inhibidor de ARNasas (40 U/μl) y se incubó durante 45 minutos a 37°C.

Para detener la reacción se colocó el tubo en hielo y se le adicionó solución ribostop (NaOAc 0.6 M pH 4, EDTA 10 mM, SDS al 1%) hasta completar un volumen final de 50 μl . Se tomó una alícuota de 1 μl del transcrito marcado al cual se le adicionaron 24 μl de solución precipitadora (EDTA 10 mM pH 8, SDS 0.1% y ARNt 0.5 mg/ml) para llevar a cabo la determinación del porcentaje de incorporación de la sonda en un contador de radiaciones β (Ver anexo 2.b).

La recuperación del transcrito marcado se llevó a cabo por extracción 1:1 (v/v) de fenol: cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), aspiración del sobrenadante por centrifugación rápida de 5 minutos a 7,000 rpm´s a TªA, extracción con 1 volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), aspiración del sobrenadante por centrifugación rápida de 5 minutos a 7,000 rpm´s a TªA, precipitación adicionando 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío guardando por 12 horas a -20°C (se puede acelerar la reacción guardando a -70°C por 4 horas mínimo). El precipitado se recuperó por centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm´s a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se le dieron 5 minutos de secado a la pastilla a TªA. El transcrito fué resuspendido en 45 μl de H₂O-ISH + 5 μl de DTT 0.1 M. Se realizó una segunda precipitación agregando nuevamente 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío y se guardó por 2 horas a -70°C. La recuperación del precipitado se efectuó por centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm´s a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se le dieron 5 minutos de secado a la pastilla a TªA, se resuspendió en 45μl de H₂O-ISH + 5 μl de DTT 0.1 M. Se tomó una alícuota de 1 μl para llevar a cabo la determinación de la eficiencia de incorporación al transcrito después de la recuperación en un contador de radiaciones β (Ver anexo 2.b).

5.2. Transcripción *in vitro* de la sonda GAD65 con digoxigenina 11 α-UTP

Debido a que la sonda GAD que emplearíamos en los ensayos de hibridación *in situ*, poseía un tamaño molecular relativamente grande (aproximadamente 824 pb), se llevó a cabo la hidrólisis alcalina de la sonda para obtener fragmentos cortos de aproximadamente 100 pb, que penetrarían con mayor facilidad los tejidos (ver anexo 3.b)

Para marcar con digoxigenina la sonda de GAD65, se desnaturalizó durante 3 minutos a 65°C 1 μg del plásmido linearizado y se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente fue resuspendido en 20 μl de mezcla de transcripción que contenía: 2 μl *buffer* de transcripción 10X, 1 μl de DTT 0.1M, una mezcla de 3 μl de nucleótidos A,G,C (10mM), 4 μl de rUTP frío 1 mM, 2 μl de digoxigenina 11 α-UTP 10 mM y 20 unidades de inhibidor de ARNasas 40U/μl). Se agregaron 30 unidades de ARN polimerasa T3 (marca Roche, 5000 u/ml) y H₂O-ISH hasta completar el volumen final. La reacción se dejó a 37°C por 1 hora, y transcurrido el

tiempo de incubación se adicionaron nuevamente 30 unidades de ARN polimerasa T3 al tubo de reacción. Se dejó 1 hora más a 37°C, se adicionaron 10 unidades de ADNasa I (10 U/μl), 20 unidades de inhibidor de ARNasas (40 U/μl), 1 μl de ARNt 10 μg/ml y se dejó incubando a 37°C por 45 minutos finales. Para detener la reacción se agregó DTT 20 mM hasta completar un volumen final de 100 μl. La precipitación del transcrito marcado se llevó a cabo adicionando 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó por 12 horas a -20°C. El transcrito fue recuperado con centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm's a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por 5 minutos a T°A. La sonda fue resuspendida en 45 μl de H₂O-ISH + 5 μl de DTT 0.1 M. Se hizo una segunda precipitación adicionando nuevamente 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío, se dejó al menos 2 horas a -70°C precipitando, el transcrito se recuperó por centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm's a 4°C, se aspiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por 5 minutos a T°A. Finalmente la sonda recuperada fue resuspendida en 45 μl de H₂O-ISH + 5 μl de DTT 0.1 M y almacenada a -70°C hasta su uso. Se tomó una alícuota de 1μl para llevar a cabo la determinación de la eficiencia de incorporación de la digoxigenina 11 α-UTP al transcrito a través de una electroforesis con gel de acrilamida (bis) al 6%, que se transfirió a una membrana de nylon para la detección de la sonda marcadas mediante una reacción de color con fosfatasa alcalina (ver anexo 3.a).

6. Hibridación *in situ* sencilla con la sonda PPII ³⁵S- α-UTP

6.1. Tratamiento de pre- hibridación para tejidos perfundidos

La preparación de los tejidos de animales perfundidos para la hibridación *in situ* se llevó a cabo en laminillas con cortes de 18 μm de grosor y mantenidas a -70°C, que fueron colocadas en jarras *koplin* y sometidas a los siguientes tratamientos, todos con agitación:

- 1 lavado en PBS 1X por 3 minutos a T°A (PBS 10X, NaCl 1.36 M, KH₂PO₄ 14.7 mM, NA₂HPO₄ 80 mM, KCl 26.8 mM, aforar a 1 L con H₂O-ISH)
- 1 lavado en tritón X-100 al 0.3%/ PBS 1X por 15 minutos a T°A
- 1 lavado en PBS 1X por 3 minutos a T°A
- Incubación con proteinasa K (1 μg/ml) preparada en fresco (EDTA 0.5 M pH 8, Tris 1 M pH 8, H₂ O-ISH) por 30 minutos a 37°C
- 1 lavado en paraformaldehído al 4%/ PBS 1X por 5 minutos a T°A
- 2 lavados en PBS 1X de 3 minutos cada uno a T°A
- Acetilación con ácido anhídrido acético 0.25%trietanolamina (0.1M)/ SSC 4X (preparar en fresco y agregar el ácido acético anhidro 1 minuto antes de usar, proteger de la luz) por 10 minutos a T°A
- 1 lavado en formamida al 50%/ SSC 2X por 30 minutos a 37°C. Mientras se van hibridando las laminillas se mantienen en esta solución.

6.2. Buffer de hibridación

Se preparó en fresco 1 ml de *buffer* de hibridación adicionando cada reactivo en el siguiente orden:

100 µl de SSC 20X, 10 µl de Denhardt's 100X, 250 µl de Tris HCl 1M pH 8, 10 µl de DTT 1M, 55 µl de H₂O-ISH, 0.1 g de dextran sulfato, 25 µl de ADNss (previamente desnaturalizado a 65°C por 10 minutos y puesto inmediatamente en hielo), 500 µl de formamida ultrapura desionizada (pre-caletada a 37°C antes de usar) y 50 µl de SDS 10%; se mezcló todo perfectamente con la ayuda de un vórtex manteniendo el tubo protegido de la luz (se guardó en un horno a 55°C durante unos minutos para facilitar que se diluyera el dextran).

6.3. Hibridación *in situ*

Cada laminilla contenía cuatro cortes de cerebro y se hibridaron con 50 µl de una mezcla de hibridación que contenía 500,000 cpm's de la sonda de PPII ³⁵S- α-UTP, 0.3 µl de DTT 1M y *buffer* de hibridación hasta completar el volumen final. La mezcla se colocó sobre los tejidos y con la ayuda de una pinza se cubrieron con un parafilm del tamaño exacto que abarcaban los cortes en cada laminilla. Con ayuda del parafilm se distribuyó de manera uniforme la mezcla de hibridación sobre los tejidos, evitando la formación de burbujas. Las laminillas se colocaron dentro de cámaras húmedas que contenían en la tapa una cama de papel absorbente con SSC 1X/ formamida 1:1. Fueron perfectamente selladas con cinta adhesiva alrededor de las cámaras y colocadas en posición vertical en un horno a 55°C durante 12 horas.

6.4. Lavados post- hibridación

Se sacaron las cajas húmedas del horno y les fue retirado cuidadosamente el parafilm a cada una de las laminillas, sumergiéndolas en *buffer* SSC 1X a T°A (SSC 20X, NaCl 3 M y Citrato de Sodio 0.3 M, aforar a 1 L con H₂O-ISH) y la ayuda de una pinza. Las laminillas fueron colocadas en jarras *koplin* y se realizaron una serie de lavados para eliminar el pegado inespecífico de la sonda. Todos los pasos fueron con agitación:

- 1 lavado en *buffer* SSC 1X por 15 minutos a T°A
- 1 lavado en *buffer* de ARNasas 1X (29.22 g de NaCl, 10 ml de Tris HCl 1M pH 8, 2 ml de EDTA 0.5M pH 8 en 1 litro de H₂O-ISH) sin enzima por 5 minutos a 37°C
- 1 lavado con ARNasa A (50 µg/ml) disuelta en *buffer* de ARNasas 1X durante 1 hora a 37°C
- 1 lavado en *buffer* SSC 1X por 15 minutos a 65°C
- 1 lavado en *buffer* SSC 0.5X por 15 minutos a 65°C
- 2 lavados en *buffer* SSC 0.1X de 15 minutos cada uno a 65°C

Los tejidos fueron deshidratados con lavados en un tren de etanol en orden de concentración: 70%, 80%, 95%, 100%, 100% de 3 minutos cada uno.

Antes de recubrir los tejidos con la emulsión fotográfica (marca NTB Kodak, ver anexos), las laminillas fueron colocadas en canastillas y se dejaron secando de 2-3 horas a T°A, cubriéndolas del polvo.

6.5. Análisis a nivel microscópico de la señal de PPII por densitometría

Los tejidos hibridados con la sonda PPII fueron examinados utilizando un analizador de imágenes Mercator; Explora Nova en un microscopio Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara de video (Sony, ExwaveHAD *color video camera*). La cuantificación se realizó en campo oscuro con el objetivo 5X. Se colocaron una a una las laminillas seleccionadas bajo el microscopio (se usaron las rebanadas que se encontraron en mejor estado tanto morfológicamente como en la señal de hibridación) y se delimitó cada una de las sub-regiones del hipocampo correspondientes a CA1, CA2, CA3, CA4 y el giro dentado con el *mouse* de la computadora. El análisis cuantitativo de la señal radioactiva (deposición de granos de plata sobre los tejidos expuestos a la emulsión fotográfica) generado por el programa Mercator, detectó en un área delimitada por el usuario la intensidad de luz reflejada por cada grano de plata, la cuál fue llamada densidad óptica integrada (DOI). El sistema Mercator, cuenta con un sensor de coordenadas que se adapta a la platina del microscopio, a la cámara de video y a un monitor que permitió observar la imagen amplificada de la señal vista con el microscopio.

7. Doble hibridación *in situ* con las sondas PPII ³⁵S α-UTP y GAD65 digoxigenina 11 α-UTP

7.1. Tratamiento de pre- hibridación de los tejidos perfundidos

Para preparar los tejidos de animales perfundidos para la doble hibridación *in situ*, las laminillas con los cortes de 18 µm de grosor previamente mantenidas a -70°C, fueron colocadas en jarras koplín y sometidas a los siguientes tratamientos, todos con agitación:

- 1 lavado en PBS 1X por 3 minutos a T°A
- 1 lavado en tritón X-100 0.3%/ PBS 1X por 15 minutos a T°A
- 1 lavado en PBS 1X por 3 minutos a T°A
- Incubación con 1µg/ml de proteinasa K preparada en fresco (EDTA 0.5 M pH 8, Tris 1 M pH 8, H₂ O-ISH) por 30 minutos a 37°C
- 1 lavado en paraformaldehído al 4%/ PBS 1X por 5 minutos a T°A
- 2 lavados en PBS 1X de 3 minutos cada uno a T°A
- Acetilación con ácido anhídrido acético 0.25%trietanolamina (0.1M)/ SSC 4X (preparar en fresco y agregar el ácido acético anhidro 1 minuto antes de usar, proteger de la luz) por 10 minutos a T°A
- 1 lavado en formamida al 50%/ SSC 2X por 30 minutos a 37°C. Mientras se van hibridando las laminillas se mantienen en esta solución.

7.2. Buffer de hibridación

Se preparó en fresco 1 ml de *buffer* de hibridación adicionando cada reactivo en el siguiente orden:

100µl de SSC 20X, 10 µl de Denhardt's 100X, 250 µl de Tris HCl 1 M pH 8, 10 µl de DTT 1 M, 55 µl de H₂O-ISH, 0.1 g de dextran sulfato, 25 µl de ADNss (previamente desnaturalizado a 65°C por 3 minutos y colocado inmediatamente en hielo), 500 µl de formamida ultrapura desionizada y 50 µl de SDS 10%; se mezcló todo

perfectamente con vórtex y el tubo de reacción se mantuvo protegido de la luz (se guardó en un horno a 55°C durante unos minutos para facilitar que se diluyera el dextran).

7.3. Doble hibridación *in situ*

Cada laminilla con cuatro cortes coroneales se hibridó con una mezcla de hibridación que contenía 500,000 cpm's de la sonda de PPII ³⁵S α -UTP, 3 μ l de sonda GAD65 digoxigenina 11 α -UTP, 0.75 μ l de DTT 1M y *buffer* de hibridación hasta completar un volumen final de 50 μ l. Los transcritos fueron previamente desnaturalizados por 5 minutos a 65°C y colocados inmediatamente en hielo. La mezcla de hibridación se colocó sobre los tejidos y con la ayuda de una pinza se cubrieron con un parafilm del tamaño exacto que abarcaban los cortes en cada laminilla. Con ayuda del parafilm se distribuyó de manera uniforme la mezcla sobre los tejidos, evitando la formación de burbujas. Las laminillas se colocaron dentro de cámaras húmedas que contenían en la tapa una cama de papel absorbente con SSC 1X/ formamida 1:1. Fueron perfectamente selladas con cinta adhesiva alrededor de las cámaras y colocadas en posición vertical en un horno a 55°C durante 12 horas.

7.4. Lavados post- hibridación y detección de la digoxigenina

Se sacaron las cajas húmedas del horno y les fue retirado cuidadosamente el parafilm a cada una de las laminillas, sumergiéndolas en *buffer* SSC 1X a T°A (SSC 20X, NaCl 3 M y Citrato de Sodio 0.3 M, aforar a 1 L con H₂O-ISH) y la ayuda de una pinza. Las laminillas fueron colocadas en jarras *koplin* y se realizaron una serie de lavados para eliminar el pegado inespecífico de las sondas. Todos los pasos fueron con agitación:

- 1 lavado en *buffer* SSC 1X por 15 minutos a T°A (SSC 20X,
- 1 lavado en *buffer* de ARNasas 1X (29.22 g de NaCl, 10 ml de Tris HCl 1M pH 8, 2 ml de EDTA 0.5M pH 8 en 1 litro de H₂O-ISH) sin enzima por 5 minutos a 37°C
- 1 lavado con ARNasa A (50 μ g/ml) disuelta en *buffer* de ARNasas 1X durante 1 hora a 37°C
- 1 lavado en *buffer* SSC 1X por 15 minutos a 65°C
- 1 lavado en *buffer* SSC 0.5X por 15 minutos a 65°C
- 2 lavados en *buffer* SSC 0.1X de 15 minutos cada uno a 65°C
- 1 lavado en solución de bloqueo (SSC 2X, tritón X-100 al 0.05%, BSA 2%) por 5 horas a T°A

A cada laminilla se le agregó una dilución 1:50 de α -digoxigenina acoplada a peroxidasa alcalina (α -dig POD) en *buffer* de dilución de anticuerpo (SSC 2X, tritón X100 al 0.3%, BSA al 1%). Se cubrieron los tejidos con parafilm nuevamente y las laminillas se colocaron cámaras húmedas que contenían en la tapa una cama de papel absorbente con H₂O-ISH. Fueron perfectamente selladas con cinta adhesiva colocada alrededor de las cámaras y colocadas a 4°C por 42 horas en posición vertical.

7.5. Incubación con α -dig- peroxidasa y revelado con un sustrato colorido

Después de la incubación con el α -dig POD las laminillas fueron sumergidas en *buffer* A (Tris HCl 0.1 M pH 7.6, NaCl 0.15 M) para retirar el parafilm cuidadosamente con la ayuda de una pinza y fueron colocadas en jarras *koplin*. Para llevar a cabo la detección de la peroxidasa en los tejidos, se realizaron los siguientes pasos:

- 2 lavados en *buffer* A de 10 minutos cada uno a T°A con agitación
- 2 lavados en *buffer* Tris 0.05 M pH 7.6 de 5 minutos cada uno a T°A con agitación
- Revelado de la actividad peroxidasa usando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.025% y H₂O₂ al 0.0036% en Tris 0.05 M pH 7.6 a 4°C (se preparó un *stock* con 0.025 g de DAB en 500 μ l de Tris 0.05 M pH 7.6; el revelado se llevó a cabo en aproximadamente 5 horas)
- 1 lavado en *buffer* Tris HCl 0.05 M pH 7.6 para detener la reacción

Las laminillas se dejaron secar de 2-3 horas a T°A antes de emulsionar con la película fotográfica (marca NTB Kodak, ver anexo 4).

7.6. Cuantificación de células positivas mediante el uso de un analizador de imágenes

Una vez realizados los ensayos de doble hibridación *in situ*, se procedió a la identificación de las células que fueron positivas a los ARN's mensajeros de interés mediante examinación de las laminillas con un sistema analizador de imágenes, Mercator; Explora Nova, en un microscopio Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara de video (Sony, ExwaveHAD *color video camera*).

La cuantificación de células se realizó en campo claro con objetivo de 20X. Fueron delineadas con el *mouse* las sub-regiones del hipocampo analizadas en este estudio correspondientes a CA1, CA2, CA3, CA4 y giro dentado. El análisis comprendió la cuantificación de cortes consecutivos de cada uno de los animales de los distintos grupos. El porcentaje de colocalización se midió con respecto al número total de células GAD65 y PPII por subregión.

8. Presentación de los datos y análisis estadístico de los resultados

Los datos cuantitativos son resumidos en forma de la media \pm el valor de el error estándar (esm). Se determinó la significancia estadística usando el análisis de varianza ANOVA de una sola vía. Cuando se compararon las diferencias entre los promedios de dos grupos, se empleó la prueba de *student*, "*t*". Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Efecto del hipertiroidismo sobre la concentración de TSH en suero de rata

El resultado del radioinmunoensayo (RIA) de las muestras de los animales administrados con 10 µg de hormona tiroidea T₃ durante 5 días, presentaron una disminución drástica en la cantidad de TSH detectada en el suero sanguíneo en relación a la detectada en los animales vehículo (1.09 ng/ml vs 0.23 ng/ml, figura 18). Esta disminución refleja el efecto de las hormonas tiroideas en la retroalimentación negativa sobre el eje HTP, tanto a nivel del NPV donde se sintetiza y secreta la TRH, como a nivel de la adenohipofisis (Lechan en 1987).

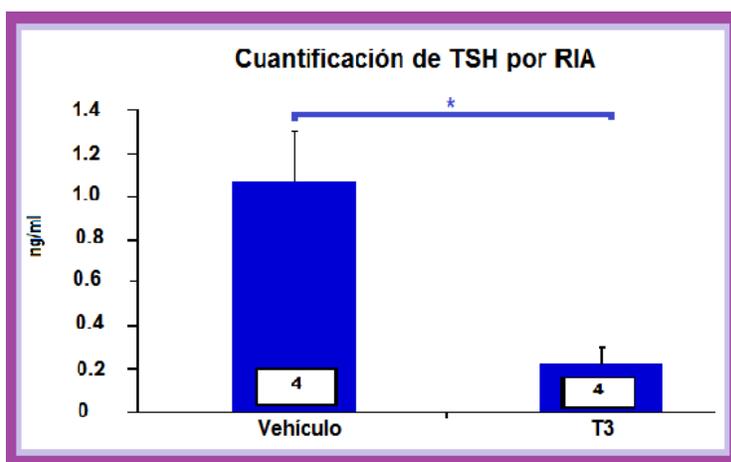


Figura 18. Efecto del tratamiento con triiodotironina, T₃ sobre los niveles de TSH en el suero de ratas detectado por RIA. La concentración circulante de TSH observada en el grupo de animales vehículo fue de 1.1 ng/ml contra 0.21 ng/ml de TSH en los animales tratados con T₃. Estos resultados muestran que el incremento en los niveles circulantes de hormona tiroidea ejercieron una inhibición del eje HTP a nivel de la síntesis y liberación de la TRH y la TSH. El número total de animales analizados en cada grupo (n) dentro de los recuadros blancos en las barras y el error estándar de la media (esm ± 0.5) se señalan. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de student (t) de dos vías (P < 0.05).

2. Las subregiones que conforman al hipocampo comprenden distintas áreas

Para llevar a cabo el análisis de la señal obtenida en los ensayos de hibridación *in situ*, es muy importante delimitar de manera correcta el área que corresponde a cada una de las subregiones que conforman al hipocampo. Los límites entre una subregión y otra pueden ser visualizados con mayor facilidad mediante el uso de tinciones sobre los tejidos que las hagan evidentes, existen diferencias además de en el tamaño, en su composición y densidad celular. Si se realiza una contra-tinción en los tejidos, incluso se pueden hacer las delimitaciones de áreas en campo claro, y después cambiar los parámetros para cuantificar la señal por densitometría en campo oscuro con un objetivo 5X; con la práctica estas diferencias entre una subregión y otra se hacen más evidentes y fáciles de reconocer sin la necesidad de hacer este tratamiento previo. La tinción de violeta de creilo, es una de las técnicas más utilizadas ya que nos permite visualizar los núcleos de

las células piramidales de CA1 a CA4 y de las granulares del GD, por ejemplo para en CA2 se observa una intensa aglomeración de núcleos en un área relativamente pequeña. Los datos ajustando el área, deben forzosamente ser tomados en cuenta a la hora de realizar la cuantificación de la señal del ARNm.

La figura 20 muestra que el área de cada subregión hipocampal va de mayor a menor magnitud en el siguiente orden: GD > CA1 > CA4 > CA3 > CA2 (figura 19). Las diferencias del tamaño entre las áreas fueron relacionadas mediante un análisis de varianza que reflejó que el área del GD es significativamente mayor que CA2 ($P < 0.001$); CA1 mayor que CA2 y CA3 ($P < 0.001$). La diferencial entre CA2 y CA3 no es significativa ($P > 0.05$).

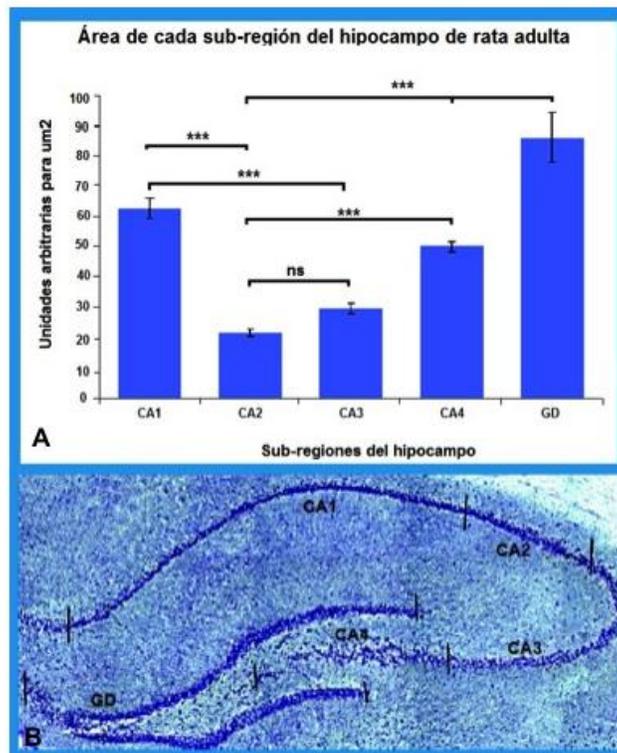


Figura 19. El área que comprende cada una de las distintas subregiones que conforman al hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4, GD) fue delimitada mediante el analizador de imágenes Mercator, para cada uno de los cortes coronales que se incluyeron en las pruebas de hibridación *in situ*. A. El área de cada subregión analizada va de mayor a menor tamaño en el siguiente orden: GD > CA1 > CA4 > CA3 > CA2. Se calculó para cada subregión el error estándar de la media ($esm \pm 0.5$), el cual es un indicativo de que la delimitación manual del área para cada cerebro analizado en los ensayos se hizo de manera correcta, no mostrando grandes variaciones en ninguna de las subregiones. El análisis de varianza de una vía reveló diferencias significativas entre CA2 vs CA1, CA4 y el GD ($P < 0.001$). B. Fotografía del hipocampo teñida con violeta de cresilo, con las subregiones delimitadas donde se pueden apreciar que los límites entre una región y otra, así como sus distintas composiciones celulares.

3. Distribución del ARNm de PPII en el hipocampo de la ratas vehículo y tratadas con T_3

Los tejidos hibridados con la sonda de PPII marcada radioactivamente (^{35}S -PPII), permitió la localización del ARNm de esta enzima en el cerebro de la rata macho adulta, el cuál coincidió con lo reportado previamente

por el grupo de Heuer et al., 2000. El analizador de imágenes Mercator; Explora Nova, en un microscopio Axioscope (Zeiss) acoplado a una cámara de video (Sony, ExwaveHAD *color video camera*) nos permitió construir un mapa formado por imágenes individuales tomadas en campo oscuro con un aumento 5X a la altura del hipocampo dorsal (figura 20). La figura nos muestra que hay una cantidad elevada de señal positiva para PPII en parte de la formación hipocampal de CA y en la corteza cerebral.

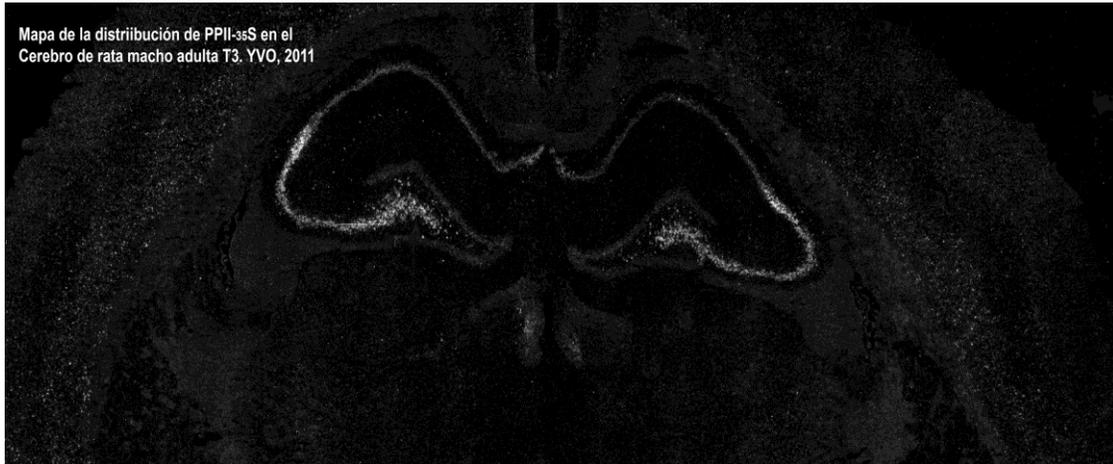


Figura 20. Mapa de la distribución del ARNm de la PPII en un corte coronal de cerebro de una rata macho adulta hipertiroidea, a nivel del hipocampo dorsal. Reconstrucción de la región formada por 135 fotografías, tomadas en campo oscuro con un aumento 5X con un microscopio adaptado a una cámara video (Sony, ExwaveHAD *color video camera*). En esta imagen podemos apreciar que PPII está ampliamente distribuido en el SNC, en regiones como la corteza, el hipocampo, presubiculo, subículo, parasubiculo.

4. Análisis densitométrico de la señal del ARNm de la PPII en el hipocampo de animales vehículos y tratados con T₃

La distribución del ARNm de la enzima PPII se realizó examinando la intensidad de luz reflejada por grano de plata dentro del área delimitada y asignándole unidades de densidad óptica integrada (DOI) x unidad de área con el analizador de imágenes Mercator; Explora Nova.

El hipocampo dorsal de los animales tratados con T₃ registró un aumento significativo en la expresión de la PPII (DOI) en la mayoría de las subregiones del hipocampo (Gráfica de la figura 21): **CA2** (1216 ± 147 vs 3220 ± 480 , ANOVA, $P < 0.001$;), **CA3** (1117 ± 148.7 vs 2515 ± 525.2 , ANOVA, $P < 0.01$), **CA4** (2106 ± 427 vs 3445 ± 504.4 , ANOVA, $P < 0.01$) y **GD** (1111 ± 115.6 vs 2110 ± 179.1 , ANOVA, $P < 0.05$); excepto en CA1 (689.6 ± 90 vs 1030 ± 131 , ANOVA, $P > 0.05$). En cada corte la señal se cuantificó en ambos hemisferios, izquierdo y derecho.

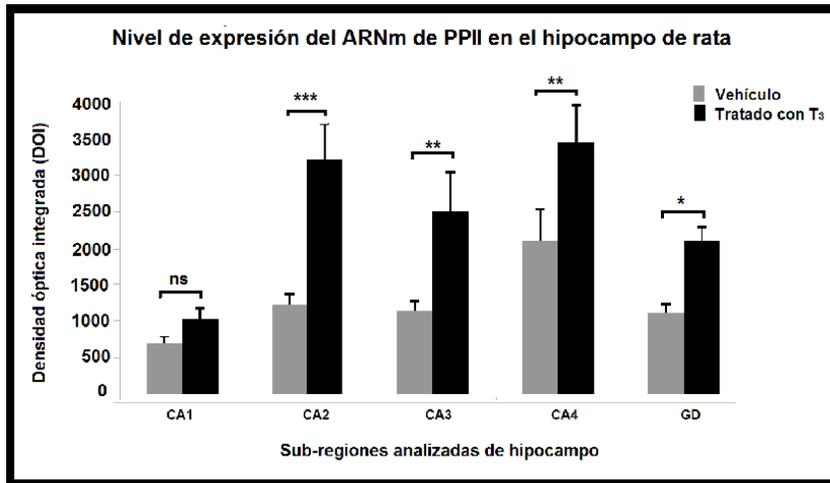


Figura 21. Efecto del tratamiento con hormona tiroidea T₃ en los niveles de expresión de la PPII en el hipocampo dorsal de rata. Cuantificación en el hipocampo de ratas vehículo (n=8) e hipertiroides (n=8) de la densidad óptica integrada dentro del área delimitada. Observamos una distribución diferencial de la señal para cada subregión del hipocampo. CA2, presentan los incrementos más consistentes en la expresión de la enzima, seguidos por CA3, CA4 y el GD (ANOVA. *= P < 0.05, **= P < 0.01, ***= P < 0.001, ns= P > 0.05).

Las imágenes comparativas de la hibridación *in situ* de PPII de un animal tratado contra un animal vehículo (figura 22), muestra las diferencias registradas por el analizador de imágenes; al comparar la señal se observa una mayor intensidad de la señal en las subregiones CA2 y CA4 de las ratas hipertiroides.

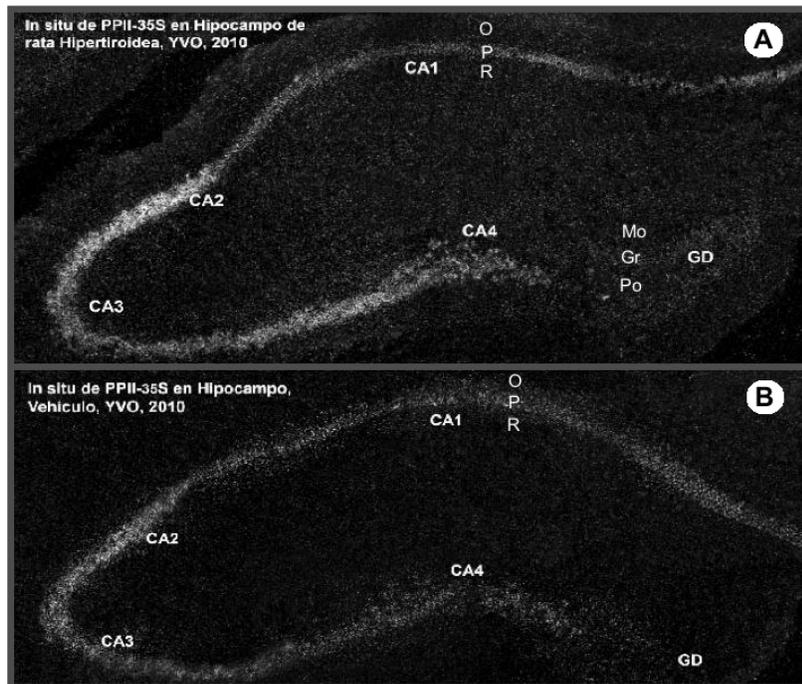


Figura 22. Expresión de la PPII en el hipocampo de ratas tratadas con T_3 y vehículos. La imagen de la hibridación *in situ* de PPII muestra las diferencias señaladas por el análisis estadístico entre la expresión de la PPII. A. Hemisferio izquierdo del hipocampo de una rata hipertiroidea. B. Hemisferio izquierdo del hipocampo de una rata hipertiroidea; y un vehículo.

5. Cuantificación de células positivas a PPII en el hipocampo de ratas hipertiroideas

Realizando un “pseudo” contraste de fases en el microscópio óptico fué posible identificar las células positivas a la señal de la PPII, detectadas mediante la técnica de hibridación *in situ* en cada una de las subregiones del hipocampo. Esta cuantificación fue obtenida de forma preliminar sin correlacionarla con al área de cada subregión, y sólo se usa para mostrar que en CA4 se observa una cantidad muy elevada de células que expresan a la PPII (figura 23).

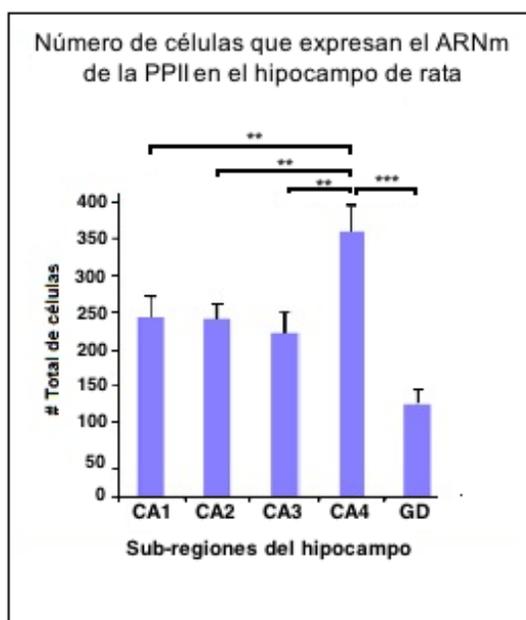


Figura 23. Número de células PPII positivas en cada una de las subregiones del hipocampo de ratas hipertiroideas. Los datos no aquí presentados no están ajustados por unidad de área de cada subregión para observar que CA4 presenta niveles muy altos de células PPII, los cuales son significativos con respecto a las células contabilizadas en el resto de las subregiones (ANOVA. **= $P < 0.01$, ***= $P < 0.001$, $n=8$).

6. Cuantificación de células positivas a GAD en el hipocampo de ratas vehículo y tratadas con T_3

Para examinar si la expresión de GAD era afectada por el tratamiento con hormona tiroidea T_3 , se realizó un análisis comparativo entre la señal positiva a GAD en el grupo de ratas vehículos, contra la señal positiva presente en el hipocampo de las ratas suministradas con T_3 . Los resultados obtenidos de la cuantificación no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos (ANOVA, $ns= P > 0.05$) en ninguna de las subregiones del hipocampo, lo cuál sugiere que el aumento en la concentración de hormona T_3 regula la expresión del ARNm de PPII pero no de GAD en el hipocampo de rata adulta (Figura 24).

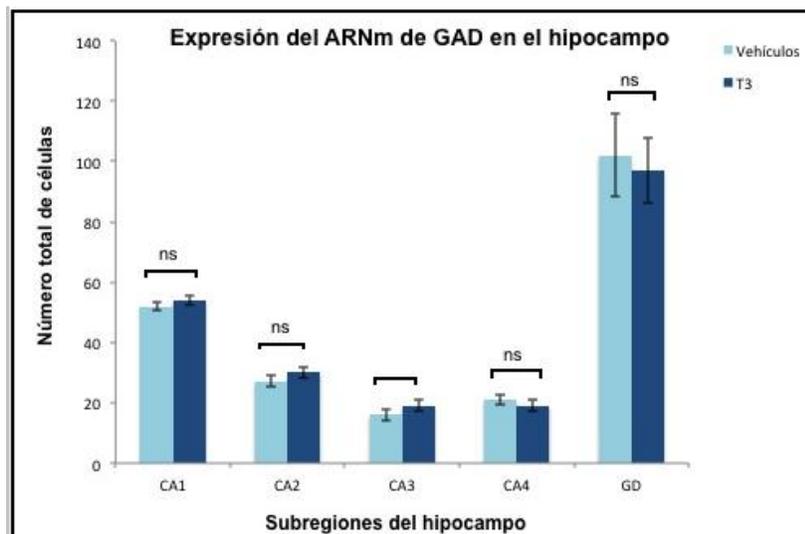


Figura 24. Número total de células que expresan al ARN mensajero de GAD65 en cada una de las subregiones del hipocampo de ratas vehículos e hipertiroideas. El tratamiento con hormona tiroidea T₃, no afectó el número de células presentes en ninguna de las subregiones del hipocampo (ANOVA, ns= P > 0.05, n=8). El resultado de la cuantificación de número de células por subregión sin ajustar el área el mayor número de neuronas de tipo GABAérgico se distribuyen en CA1 y el GD (ANOVA, ns= P > 0.05, n=8).

7. Distribución del ARNm de GAD en el hipocampo de rata hipertiroidea

Ya que el número de células positivas a GAD65 presentes en el hipocampo no muestran diferencias entre los grupos tratado y vehículos, las cuantificaciones en los siguientes ensayos se realizaron en los tejidos del grupo de ratas tratadas con la hormona tiroidea T₃, en las cuáles es fácil apreciar la señal de la PPII.

Los ensayos de hibridación *in situ* sencilla en los que se utilizando la sonda de ARN antisentido para GAD65-digoxigenina, mostraron que su expresión fue positiva en todas las suregiones del hipocampo, con niveles mayores en la parte más profunda de la capa gular y el hilus del giro dentado. Estas observaciones coinciden con los resultados publicados por Esclapez, et al., 1994 (figura 25.A); en esta misma referencia se afirma que la distribución de la isoforma GAD67 es similar a la de GAD65 en el hipocampo de rata, por lo que los ensayos de hibridación *in situ* sencilla y doble colocalización se centraron unicamente en la detección de la isoforma GAD65, facilitando la investigación.

A través de un mapa construido por imágenes individuales tomadas en campo claro con un objetivo 5X del hemisferio izquierdo del hipocampo dorsal, observamos que la distribución de las células positivas al ARNm de GAD estuvo presente en todas las subregiones del hipocampo, en cortes coronales del hipocampo de rata macho adulta (Figura 25.B). Otra región del cerebro donde se observó una amplia distribución de señal GAD positiva fué la corteza cerebral. Las células marcadas son resultado de un precipitado perinuclear formado por la actividad de la peroxidasa.

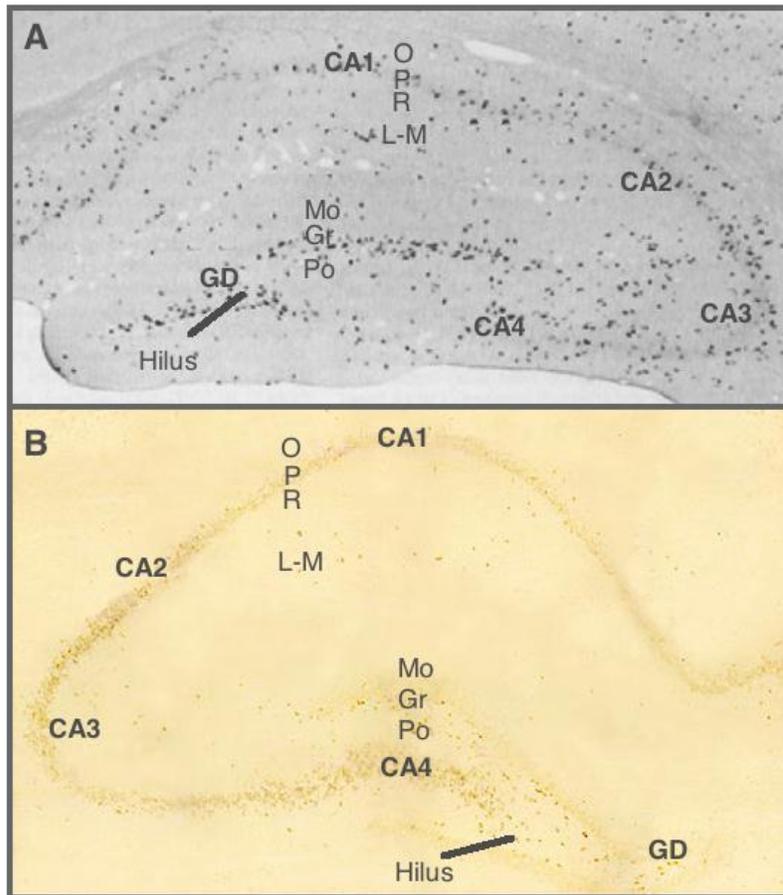


Figura 25. Distribución del ARNm de GAD65 en el hipocampo de rata macho adulta. A. Distribución de las células GAD65 reportada por Esclapez, et al., 1994, se observa que en la parte más profunda de la capa de células polimórficas del GD y en el hilus hay un mayor número de células GAD positivas con respecto al resto de las subregiones de CA. B. La distribución observada en los ensayos de hibridación *in situ* sencilla usando la sonda antisentido GAD65-digoxigenina muestran una distribución similar a la reportada por Esclapez, et al., 1994. CA, Cuerno de Ammon, GD, giro dentado; Gr, capa de células granulares; L-M, estrato lacunosum-moleculare; Mo, capa de células moleculares; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; Po, capa de células polimórficas; R, estrato radial.

8. Análisis cuantitativo del número de células que expresan a PPII o GAD en el hipocampo de ratas hipertiroideas

Se compararon directamente los datos obtenidos de las cuantificaciones de células PPII o GAD, mediante las cuáles observamos que el número total de células que expresan al ARNm de GAD65 es notablemente menor que número total de células PPII en la mayoría de las subregiones del hipocampo, excepto el GD. En la gráfica (figura 26) es evidente que en CA4 el número total de células PPII positivas es significativamente mayor que las registrada en el GD (ANOVA. $P < 0.001$), y justamente el GD y CA1, son las subregiones donde se observa el mayor número de células GABAérgicas. Sin embargo, sólo en el GD esta diferencia fue significativa (GD vs CA1, CA2, CA3, CA4, ANOVA. $P < 0.001$).

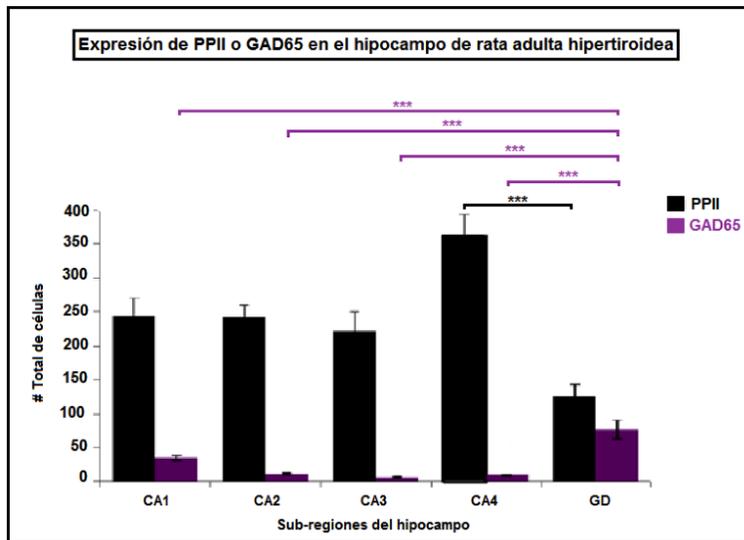


Figura 26. Número de células que expresan al ARNm de PPII o GAD65 en cada una de las subregiones del hipocampo de rata macho adulta, sin realizar un ajuste por áreas. En la gráfica se resume la información presentada en las dos gráficas anteriores (23 y 24). Aquí se muestra claramente que el número de células PPII es mayor al número de células GABAérgicas detectadas por el ensayo de hibridación *in situ* (ANOVA * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, $n=8$).

9. Análisis densitométrico del número de células que expresan a la PPII o GAD en el hipocampo de ratas hipertiroideas

Los datos mostraron que realizando un ajuste del número de células registradas tomando en cuenta el área delimita para cada subregión, se obtiene un dato más sobre la densidad de celulas positivas a cada sonda. En esta gráfica de densidad (figura 27), se observa que CA2 presenta una mayor densidad de celulas PPII con respecto al resto de las subregiones del hipocampo (ANOVA. $P < 0.001$).

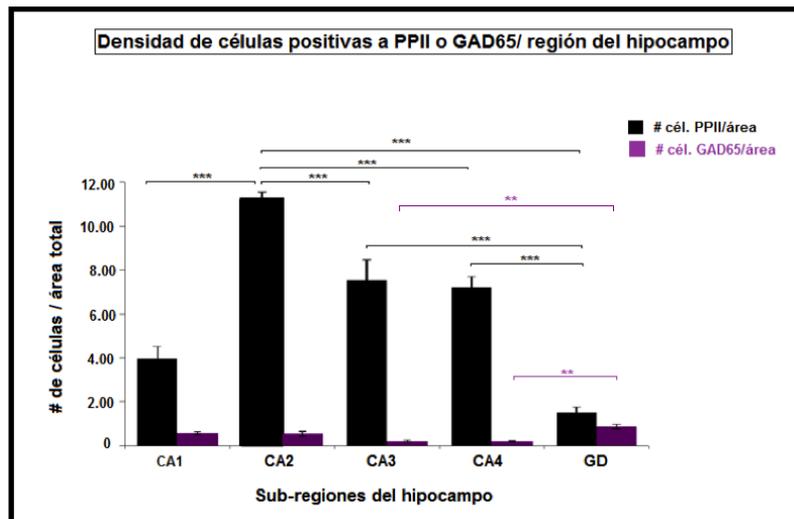


Figura 27. Densidad de células PPII o GAD65 por subregión del hipocampo de rata macho adulta. El número de células fué ajustado al área delimitada para cada subregión. La densidad de células de PPII (barras negras) en CA2 hace a esta región significativamente distinta a las demás subregiones del hipocampo. Además se observa una notable población de células GABAérgicas (barras moradas) en el GD que es significativamente mayor que las cantidades registradas en CA3 y CA4 (ANOVA. * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$).

10. Distribución de las células positivas a PPII y GAD en el hipocampo de ratas hipertiroideas detectada por ensayo de doble hibridación *in situ*

Finalmente para determinar si la distribución del ARNm observada para cada enzima coincidía en las mismas células en algunas de las subregiones del hipocampo, se realizaron ensayos de doble hibridación *in situ* y se realizó un análisis de las imágenes para determinar si el precipitado perinuclear producido por la unión de la peroxidasa con su sustrato (observado como círculos color café), sobrelapaba con la expresión de la PPII visualizada como granos de plata sobre los tejidos, resultado de la exposición y revelado de la emulsión fotográfica. Se realizó el análisis cuantitativo de las células que co-expresaron ambos ARN's mensajeros en las distintas subregiones del hipocampo, indicando que tan común es esta colocalización. El resultado del análisis reveló que existe colocalizaciones de PPII-GAD en todas las subregiones del hipocampo, sin embargo, el número de coincidencias es diferencial entre una subregión y otra. Todo el análisis se realizó en cortes del grupo de ratas hipertiroideas para facilitar la detección del ARNm de la PPII en los sitios donde hay baja expresión de la enzima, como en el giro dentado.

A continuación se presentan de manera detallada imágenes con la colocalización de ambas enzimas en cada subregión del hipocampo dorsal de rata. Aunque la distribución de células GAD se encontró a través de todas las capas que conforman a subregiones del hipocampo, las colocalizaciones con PPII se detectaron maoritariamente en la capa piramidal de CA. Por el contrario, en el giro dentado, la distribución heterogénea de células GAD positivas localizadas principalmente hacia la parte más profunda de capa polimórfica y el hilus no coinciden en su totalidad con la distribución de la señal de PPII confinada a la capa granular del GD.

10.1. Distribución en la subregión CA1

En el mapa de la figura 28 se puede observar un tejido de hipocampo con tinción de violeta de cresilo, que delimita el área donde se hicieron las cuantificaciones para CA1(A), así como los distintos estratos que lo conforman. En los demás paneles de la imagen (B-D) se pueden apreciar fotografías tomadas a diferentes aumentos (10X, 20X y 40X) que señalan células doblemente marcadas. La colocalizaciones cuantificadas mediante el analizador de imágenes, Mercator, indicó que de la población total de células PPII contabilizadas en CA1 alrededor del 7.6% son de origen GABAérgico, el otro 92.4% exhibe algún otro fenotipo aún no conocido. El 7.6% de células doblemente marcadas PPII-GAD representan el 35.5% de la población total de células GABAérgicas detectadas en esta subregión (figura 29).

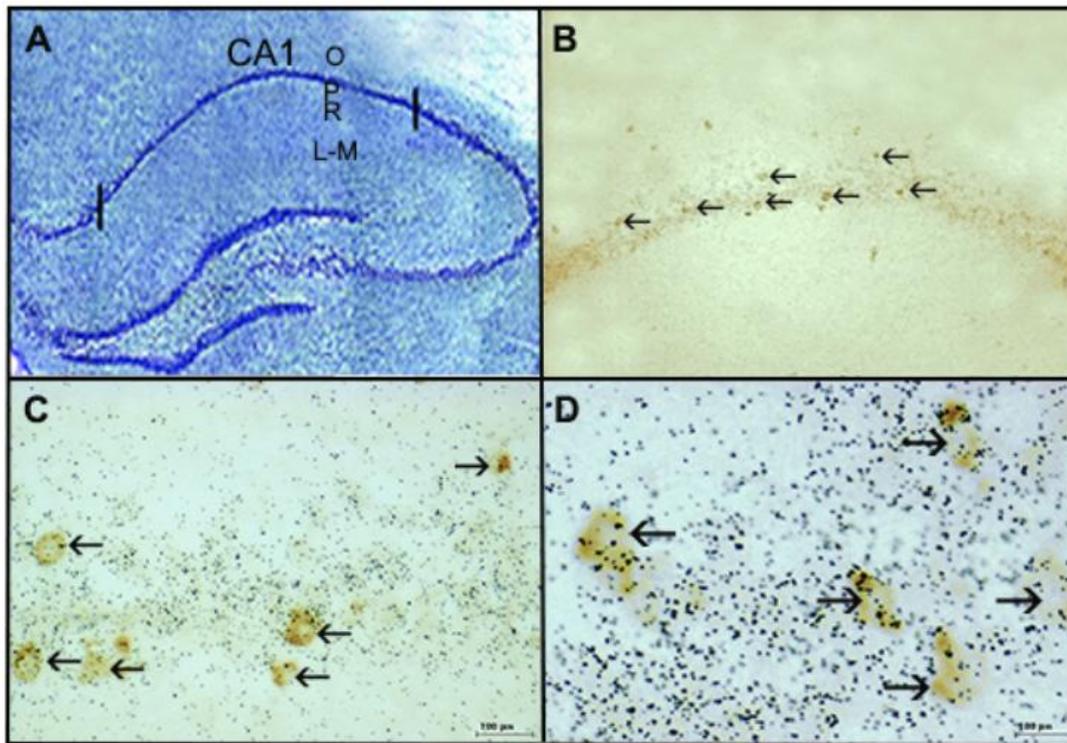


Figura 28. Mapa representativo de la distribución de las células doblemente positivas a los ARN's mensajeros de PPII-GAD65 en CA1 del hipocampo. A. Imagen del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, delimitando el área que abarca CA1, así como los estratos que lo conforman. B. CA1, 5X. C. CA1, 10X y D. CA1, 40X de imágenes con colocalizaciones PPII-GAD. Las flechas negras delgadas señalan las células marcadas con la sonda antisentido de GAD65 (digoxigenina = color café) con sobreposición de granos de PPII (puntos negros dentro de las células color café) detectadas por el ensayo de doble hibridación *in situ*. En esta subregión se observó una densidad de células GABAérgicas significativamente mayor que la observada en CA3 y CA4, sin embargo, el número de células que co-expresaron ambos ARN's mensajeros es similar al observado en todas las subregiones de CA. Las colocalizaciones estuvieron confinadas a la capa de células piramidales donde la señal de PPII es prominente. CA, Cuerno de Ammon; L-M, estrato lacunosum-molecular; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; R, estrato radial.

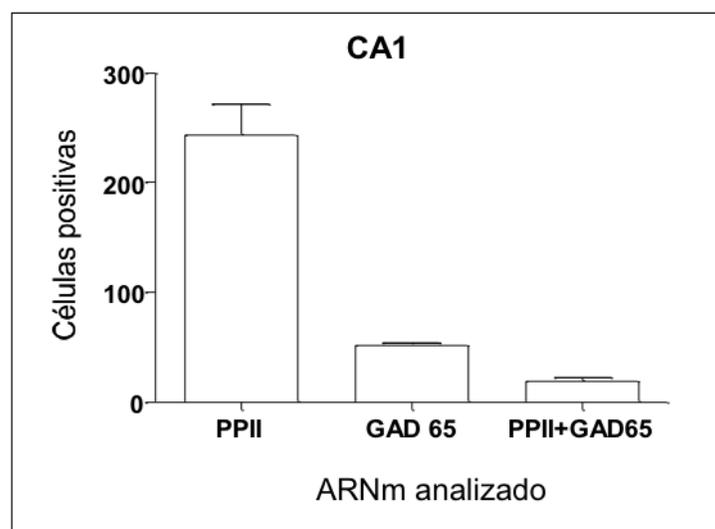


Figura 29. Cuantificación del número de células que co-expresan el ARNm de la PPII y GAD65 en CA1. Mediante el analizador de imágenes, Mercator, se contabilizó el número de células correspondiente a cada una de las poblaciones de interés y se determinó que de

la población total de células PPII en CA1, alrededor del 7.6% exhiben un fenotipo GABAérgico, las cuáles corresponden al 35.5% de la población total de neuronas GABAérgicas de la subregión.

10.2. Distribución en la subregión CA2

Las células doblemente marcadas para PPII-GAD, se localizaron principalmente en la capa piramidal de CA2 y a diferencia de las colocalizaciones observadas en las demás subregiones analizadas, las células GAD mostraron una elevada saturación de granos de plata, correspondientes a la señal de la PPII. En la imagen 30, se muestra un corte del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, que delimita el área donde se hicieron las cuantificaciones para CA2 (A), así como los estratos que lo conforman. En los demás paneles de la imagen se pueden apreciar fotografías tomadas a diferentes aumentos (B, 10X. C, 20X y D, 40X) que señalan las células doblemente marcadas.

La densidad celular de PPII en CA2 es más elevada que en cualquier otra subregión analizada, sin embargo, de esta población, alrededor del 6.5% fué de origen GABAérgico, por lo que inferimos que la mayoría de las células de PPII presentes en esta subregión son de otro origen neuronal aún desconocido. Las células GAD que coéxpreron a la PPII correspondieron al 58.9% de la población total de tipo GABAérgico aquí registrada (Gráfica de la figura 31).

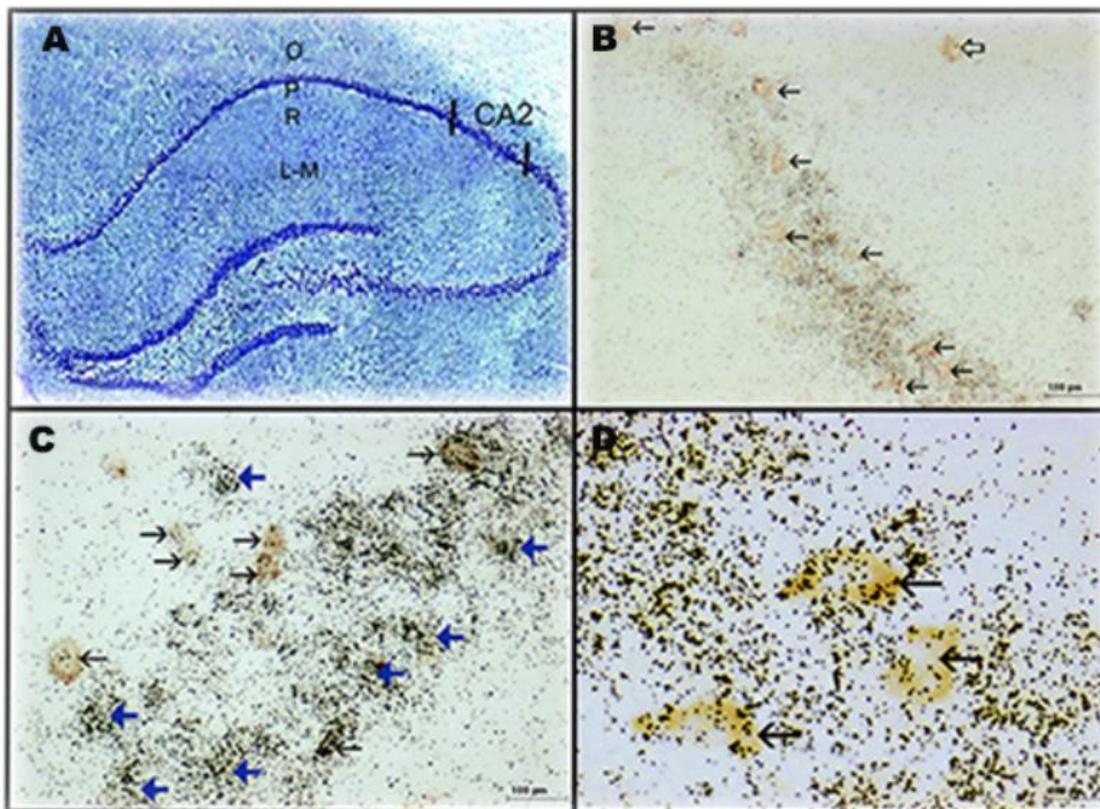


Figura 30. Mapa de imágenes representativas de la distribución de las células doblemente positivas al ARNm de GAD65 y PPII en CA2 del hipocampo. A. Imagen del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, delimitando el área que abarca CA2 y

los estratos que lo conforman. B. CA2, 10X. C. CA2, 20X. D. CA2, 40X señalando células colocalizadas. Las flechas azúles y grandes, señalan células marcadas como positivas únicamente para PPII; las flechas blancas de contorno negro, señalan células únicamente positivas a GAD (B); las flechas negras delgadas señalan las células doblemente marcadas PPII-GAD. CA, Cuerno de Ammon; L-M, estrato lacunosum-moleculer; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; R, estrato radial.

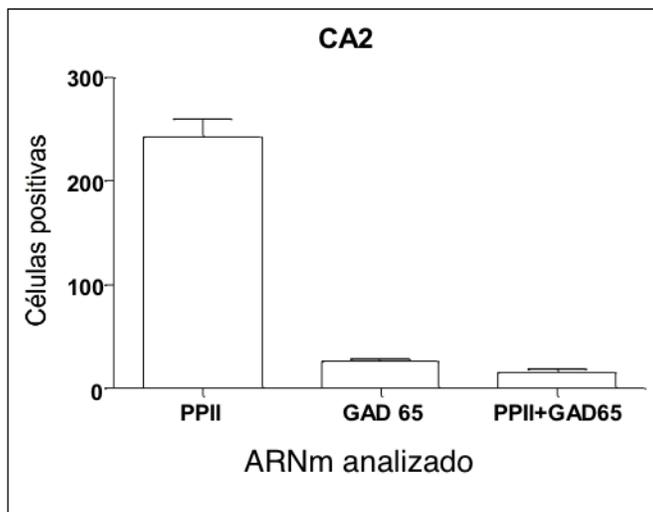


Figura 31. Cuantificación del número de células que co-expresan el ARNm de la PPII y GAD65 en CA2 del hipocampo. Mediante el analizador de imágenes, Mercator, se contabilizó el número de células correspondientes a las poblaciones de interés. Se determinó que de la población total de células PPII positivas, alrededor del 6.5% exhiben el fenotipo GABAérgico, que corresponden al 58.9% del total de la población GABAérgica presente en esta zona.

10.3. Distribución en la subregión CA3

En la figura 32 se muestra un corte del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, que delimita el área donde se hicieron las cuantificaciones para CA3 (A), este reactivo químico se une principalmente al DNA por lo cuál podemos visualizar la tinción de los núcleos, los cuáles muestran una mayor densidad dentro de la capa piramidal de CA y la capa granular del GD. En la imagen se pueden apreciar los distintos estratos que la conforman a CA3. En los demás paneles de la imagen se aprecian fotografías con diferentes aumentos (B, 10X. C, 20X y D, 40X) que señalan células doblemente marcadas.

En esta subregión se observó que de la población celular de PPII únicamente el 4.3% es de tipo GABAérgico, este porcentaje de células corresponde al 60% de población total de células GABAérgicas presentes en esta zona del hipocampo (Figura 33).

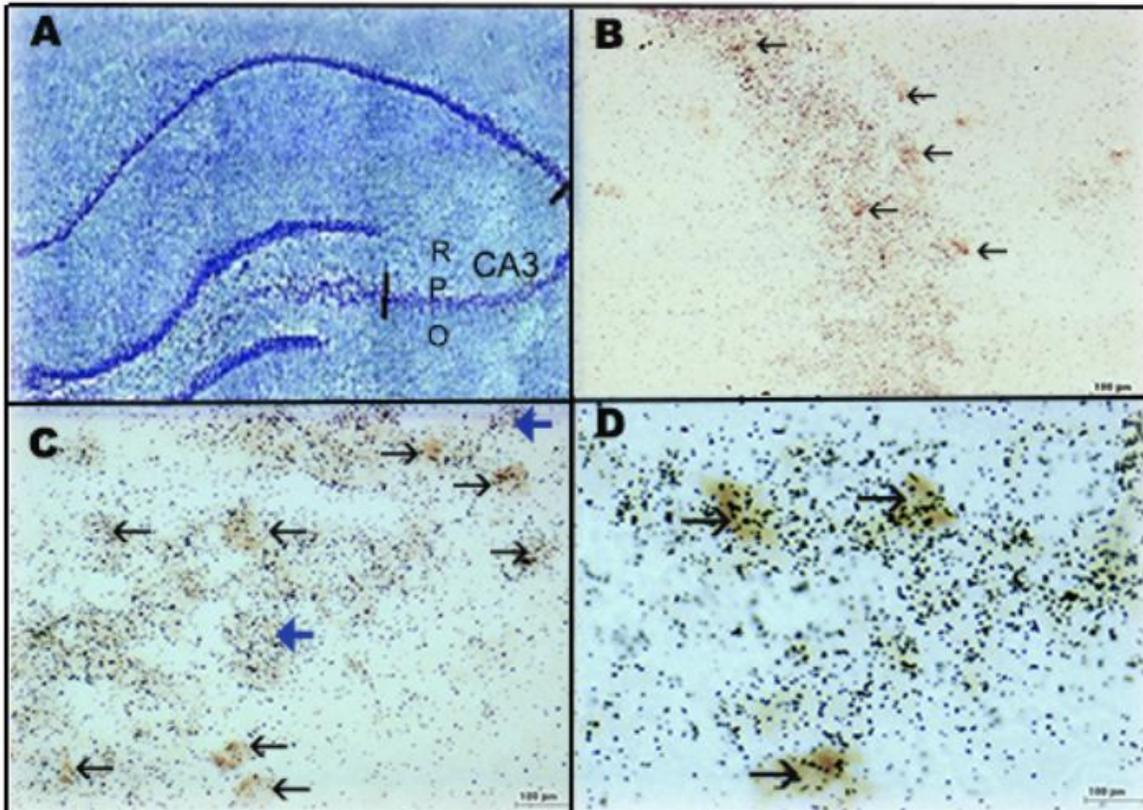


Figura 32. Mapa de imágenes representativas de la distribución de las células doblemente positivas al ARNm de GAD65 y PPII en CA3 del hipocampo. A. Imagen del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, delimitando el área que abarca la subregión de CA3 y los distintos sustratos que la conforman. B. CA3, 10X. C. CA3, 20X y D. CA3, 40X señalando células colocalizadas en distintos aumentos. Las flechas azules grandes señalan algunas células positivas únicamente al ARNm de PPII, las cuáles están ampliamente representadas en esta subregión. Las flechas negras delgadas señalan las células que expresan los ARN's mensajeros PPII-GAD. CA, Cuerno de Ammon; L-M, estrato lacunosum-molecular; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; R, estrato radial.

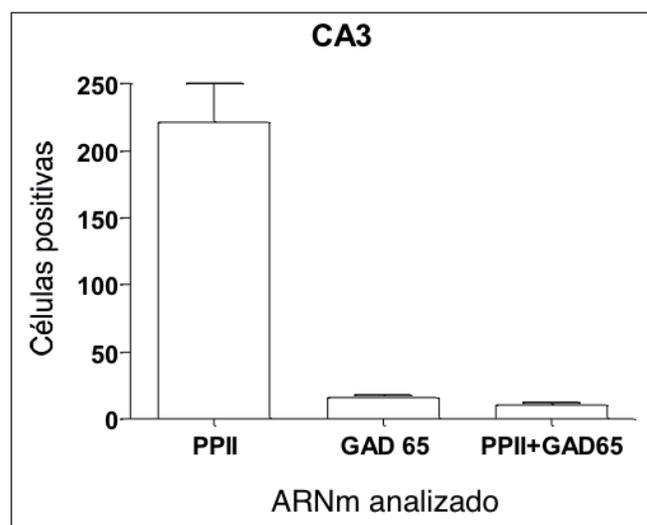


Figura 33. Cuantificación de las células donde el ARNm de GAD65 y de PPII colocaliza en CA3 del hipocampo. A. Mediante el analizador de imágenes, Mercator, se contabilizó el número de células correspondientes a las poblaciones de interés y se determinó que de la

población total de células positivas a la PPII alrededor del 4.3% exhiben el fenotipo GABAérgico, las cuáles representan el 60% de la población GABAérgica presente en esta zona del hipocampo.

10.4. Distribución en la subregión CA4

Existe una importante densidad celular de PPII en CA4; con una característica única ya que forman aglomeraciones circulares grandes y bien definidas, con una distribución dispersa a través de toda la capa piramidal de esta subregión, contrario a lo observado en CA1, CA2 y CA3 donde la población celular dentro de la capa piramidal se encuentra muy compacta. Dentro de CA4 encontramos que las células que co-expresan a PPII y GAD. En la imagen de la figura 34, se muestra un corte del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, que delimita el área donde se hicieron las cuantificaciones para CA4 y los estratos que lo conforman (A), en los demás paneles de la imagen se pueden apreciar fotografías tomadas a diferentes aumentos (B, 10X. C, 20X y D, 40X) que señalan células doblemente marcadas. De la población de células que expresan a la PPII alrededor del 3% mostraron tener fenotipo GABAérgico, las cuáles representan el 52.4% del total de células GABAérgicas en esta subregión (Gráfica de la figura 35).

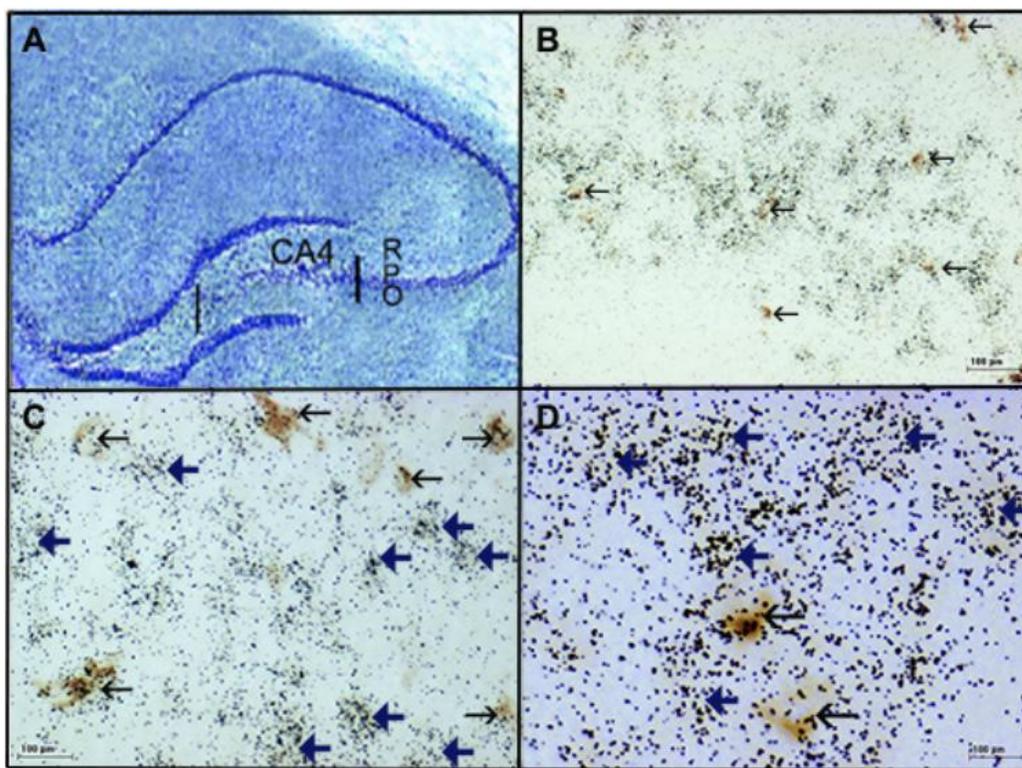


Figura 34. Mapa con imágenes representativas de la distribución de las células doblemente positivas al ARNm de GAD65 y PPII en CA4 del hipocampo. A. Imagen del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo delimitando el área que abarca la subregión de CA4 y los estratos que lo conforman. B. CA4, 10X. C. CA4, 20X. D. CA4, 40X imágenes en distintos aumentos de las colocalizaciones detectadas en el área. Las flechas azules grandes señalan células positivas únicamente al ARNm de PPII, las flechas negras delgadas señalan las células que expresaron a los ARN's mensajeros de la PPII y de GAD65. CA, Cuerno de Ammon; L-M, estrato lacunosum-molecular; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; R, estrato radial.

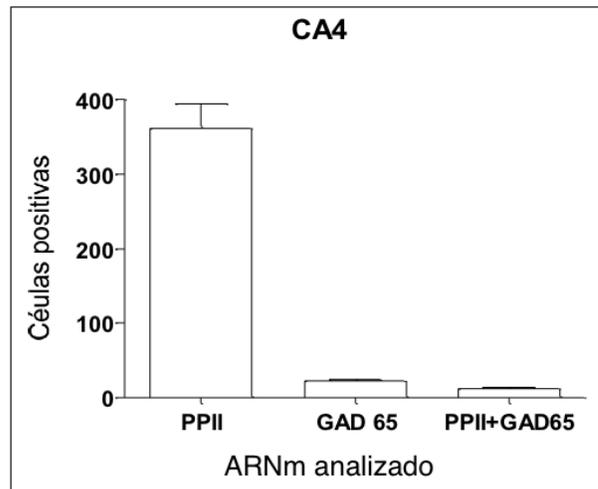


Figura 35. Cuantificación del número de células que co-expresan el ARNm de la PPII y GAD65 en CA4 del hipocampo. Mediante el analizador de imágenes, Mercator, se contabilizó el número de células correspondientes a las poblaciones de interés. De la población total de células PPII en CA4, se determinó que alrededor del 3% son de tipo GABAérgico, las cuáles representan aproximadamente el 52.4% de la población de células GABAérgica de esta subregión.

10.5. Distribución en la subregión del giro dentado

El giro dentado es una subregión muy interesante para analizar. En la imagen 36, se muestra un corte del hemisferio derecho del hipocampo con tinción de violeta de cresilo, que delimita el área donde se hicieron las cuantificaciones para el GD (A), así como los estratos que lo conforman. En los demás paneles de la imagen se aprecian fotografías tomadas a diferentes aumentos (B, 10X. C, 20X y C, 40X) que señalan células doblemente marcadas PPII-GAD. Es importante hacer notar que de la población doblemente marcada PPII-GAD, en esta subregión en específico, el número de granos de plata fue de alrededor de 10-20 por célula GAD (se observa claramente en 36. D), lo cuál contrasta con el número exacerbado de granos observados dentro de las células GAD en las otras subregiones del hipocampo (mayor a 20 granos por célula). En esta zona del hipocampo se detectaron los niveles más bajos tanto del ARNm de PPII, así como del número de células que la expresan (125 células en promedio, e.s.m. = 18); contrario a lo detectado en la expresión del ARNm de GAD, que registró aquí sus niveles más altos de expresión (102 células en promedio, e.s.m. = 13); sin embargo, de la abundante población de células GABAérgicas, sólo alrededor del 25% co-expresaron al ARNm de la PPII, lo cuál representa una fracción del 20% de la población de células PPII en esta subregión, el otro 80% de las células PPII expresan algún fenotipo aún desconocido (Gráfica de la figura 37). Se realizó un mapa formado de fotografías individuales de un corte doblemente marcado PPII-GAD donde se puede apreciar la distribución de la población GABAérgicas hacia la parte profunda de la capa polimórfica y el hilus del giro dentado (Imagen de la figura 38).

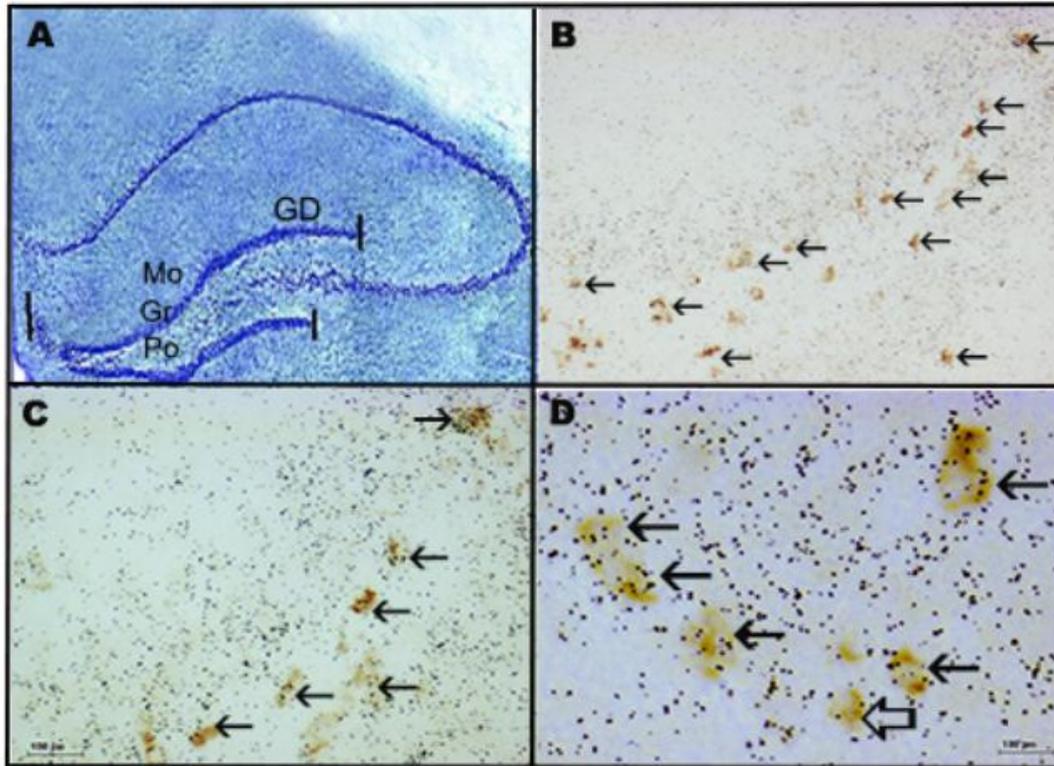


Figura 36. Mapa representativo de la distribución de las células doblemente positivas donde el ARNm de GAD65 y de la PPII colocaliza en el GD. A. Imagen del hemisferio derecho del hipocampo, con tinción de violeta de cresilo, delimitando el área que abarca la subregión del GD. B. GD, 10X. C. GD, 20X. D. GD, 40X. Las flechas azules grandes señalan células positivas únicamente al ARNm de PPII, las flechas negras delgadas señalan las células que expresaron a los ARN's mensajeros de la PPII y de GAD65. GD, giro dentado; Gr, capa de células granulares; Mo, capa de células moleculares; Po, capa de células polimórficas.

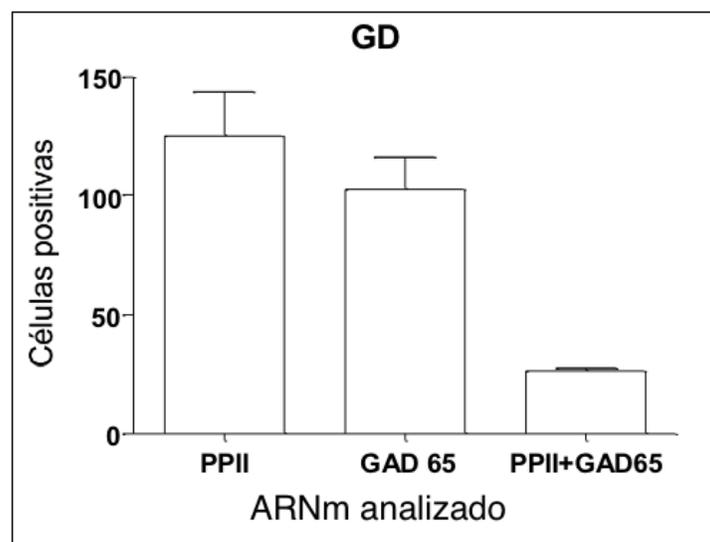


Figura 37. Cuantificación de las células positivas donde el ARNm de GAD65 y PPII colocaliza en el GD del hipocampo. Mediante el analizador de imágenes, Mercator, se contabilizó el número de células correspondientes a las poblaciones de interés y se determinó que

alrededor del 25% de la población de células GABAérgica co-expresa al ARNm de la PPII, lo cuál representa una fracción del 20% de la población total de células PPII de esta zona, el otro 80% de las células PPII expresan algún fenotipo aún desconocido.

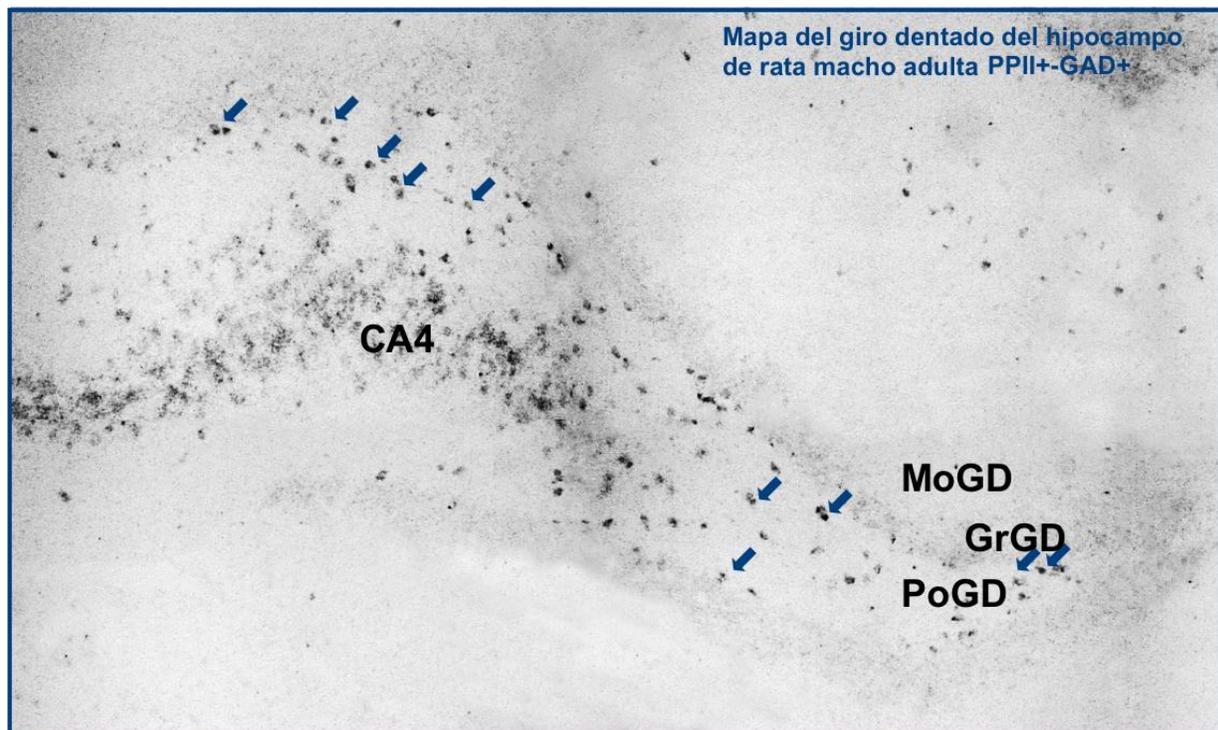


Figura 38. Mapa de la subregión del giro dentado del hipocampo de la rata macho adulta. En esta imagen formada de fotografías individuales tomadas con un aumento 5X, en campo claro, se puede apreciar la distribución de la población GABAérgicas del giro dentado confinada hacia la parte profunda de la capa polimórfica y el hilus. Las Flechas señalan células doblemente positivas PPII-GAD-GrGD, capa de células granulares del giro dentado; MoGD, capa de células moleculares del giro dentado; PoGD, capa de células polimórficas del giro dentado.

La siguiente imagen (figura 38) es sólo un resumen de lo analizado en las secciones anteriores que nos permite visualizar en su conjunto, las colocalizaciones detectadas en cada una de las distintas subregiones que conforman al hipocampo.

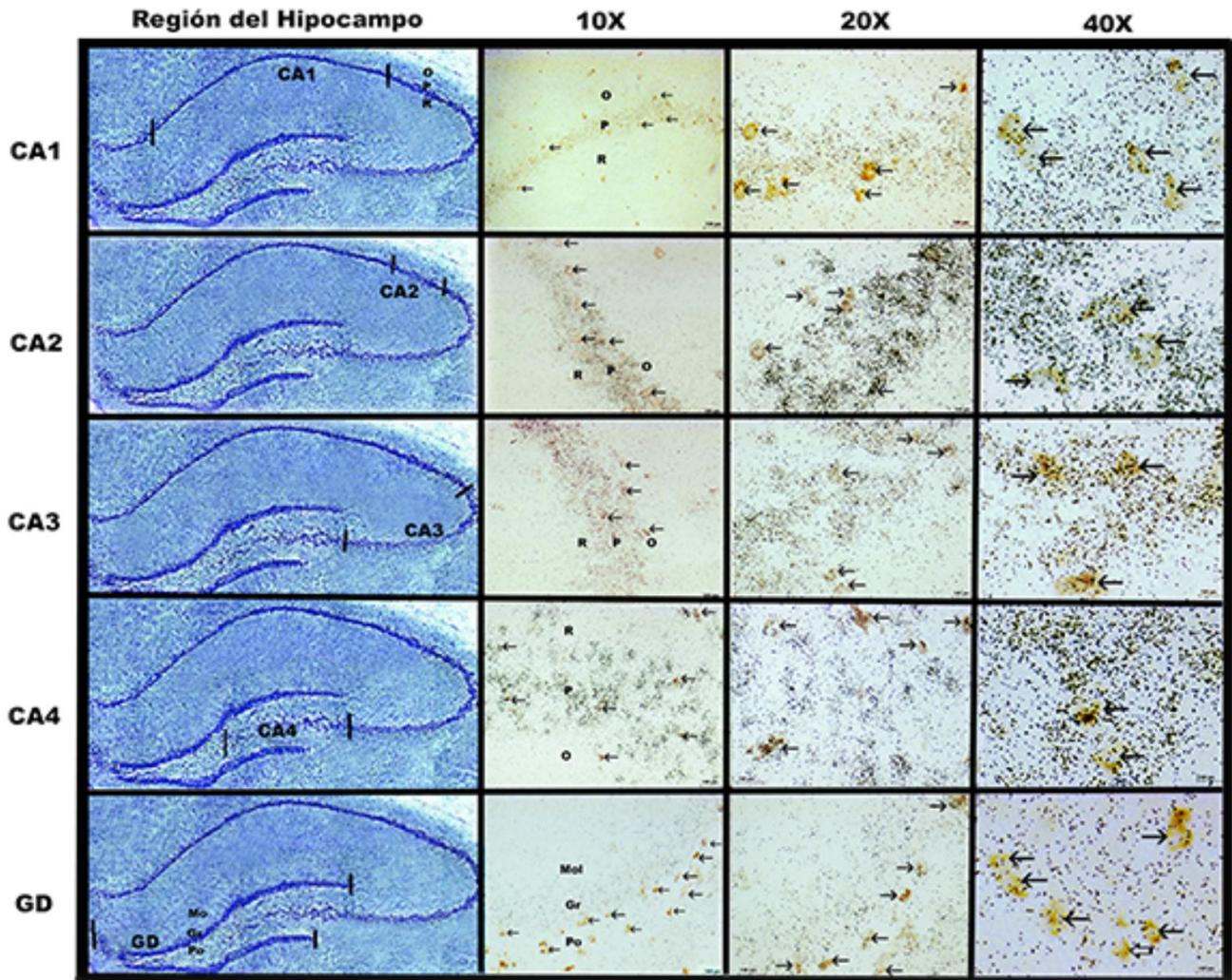


Figura 38. Mapa representativo de la distribución de las células doblemente marcadas para la detección del ARNm de GAD65 y PPII en las subregiones que conforman al hipocampo dorsal de la rata macho adulta. En la columna de la izquierda, se muestran imágenes del hemisferio derecho del hipocampo, con tinción de violeta de cresilo, delimitando las áreas que abarcan cada una de las subregiones del hipocampo. Las demás columnas presentan fotografías tomadas en campo claro, con distintos aumentos del objetivo (10X, 20X y 40X) señalando con flechas las células doblemente marcadas por ensayo de doble hibridación *in situ*, así como la identificación de algunas células que expresaron únicamente alguna de las dos sondas. Las flechas azules señalan células positivas al ARNm de la PPII, las flechas negras delgadas señalan las células que expresaron a los dos ARN's mensajeros PPII-GAD65. CA, Cuerno de Ammon, GD, giro dentado; Gr, capa de células granulares; L-M, estrato lacunosum-molecular; Mo, capa de células moleculares; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; Po, capa de células polimórficas; R, estrato radial.

11. Cuantificación del número de células que coexpresan el ARNm de PPII y GAD en el hipocampo mediante un analizador de imágenes

Los datos presentados en la gráfica de la figura 39, muestran claramente como las células doblemente marcadas PPII-GAD identificadas mediante este ensayo, representan una pequeña fracción de la población total de células que expresan el ARNm de la PPII en el hipocampo dorsal de la rata. Y como esta población de células PPII, excede de manera notable a la población de células GABAérgicas identificadas. Sumando el total de células PPII del hipocampo y comparándola con las otras poblaciones de interés, pudimos inferir que solamente el 6.75% de las células PPII son de tipo GABAérgico, por lo tanto, el resto de la población (93.25%) se expresan en células con un fenotipo aún desconocido.

Los resultados de las cuantificaciones de las células que co-expresaron los ARN's mensajeros de la PPII y GAD, después de ser sometidos a una prueba estadística (análisis de varianza de una sola vía, ANOVA, $P < 0.05$, $esm \pm 0.5$), señalaron que el número de células dobles del GD es significativamente mayor al registrado en CA3 y CA4; pero no al detectado en CA1 y CA2, donde no hubo diferencias significativas (ANOVA de una sola vía. $* = P < 0.05$, $ns = P > 0.05$, e.s.m. ± 0.5 , $n=8$).

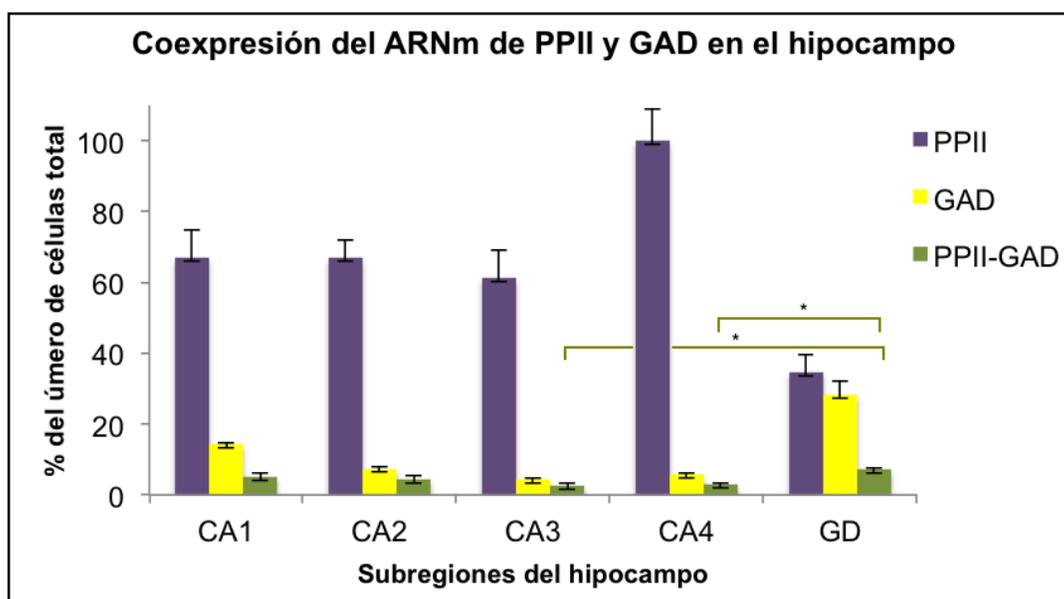


Figura 39. Datos presentados en porcentaje del número de células cuantificadas que expresan a PPII, GAD65 ó GAD65-PPII en el hipocampo dorsal de ratas macho adultas. El conteo de células únicamente positivas a PPII (barras moradas) muestra que esta población es notablemente más abundante que la población GABAérgica localizada en esta región del cerebro (barras amarillas); y que el porcentaje de células que colocalizaron a los ARN's mensajeros de PPII-GAD, representa solo una fracción de las células que expresan a la PPII en el hipocampo. Todas las subregiones del hipocampo co-expresan células PPII-GAD, sin embargo, las coincidencias fueron más comunes en el GD en comparación a las detectadas en CA3 y CA4 (Análisis de varianza de una sola vía, ANOVA. $* = P < 0.05$, $esm \pm 0.5$, $n=8$).

DISCUSIÓN

La piroglutamil peptidasa II es una enzima cuya función propuesta es la hidrólisis del péptido de la TRH en el medio extracelular del cerebro, y pudiera contribuir por lo tanto a terminar eficazmente con su actividad biológica. Esta hipótesis se sustenta en varios tipos de argumentos, en particular, la enzima tiene una especificidad estrecha, con TRH como su único sustrato biológico; por otro lado, esta enzima es una ectoenzima, por lo que su sitio activo esta localizado en el medio extracelular, en una posición ideal para hidrolizar a la TRH liberada al medio extracelular; adicionalmente, la inhibición de la actividad de la PPII en rebanadas de cerebro incrementa la recuperación del péptido liberado al medio extracelular. Finalmente, la inhibición de la actividad de la PPII en el séptum medio *in vivo* potencia uno de los efectos biológicos de la TRH, su efecto analéptico.

Estos argumentos bioquímicos son contrastados por datos que muestran que la distribución de la PPII es muy peculiar, y que existe una coincidencia solo parcial entre la distribución del ARNm de la PPII y de los ARN's mensajeros de los receptores de la TRH en el cerebro. Este es por ejemplo el caso del hipocampo, una región con una de las mayores concentraciones de enzima PPII, pero con niveles limitados de los receptores. Entender el significado funcional de esta discrepancia pudiera llevar a nuevos conceptos sobre la relación entre ectopeptidasas y la comunicación peptidérgica. Este problema se tiene que abordar de varias maneras, incluyendo la obtención de un conocimiento más preciso de los circuitos neuronales que expresan a la PPII.

La información existente hasta la fecha sobre la distribución de la PPII no incluye el fenotipo de las neuronas que la expresan. Para poder empezar a clarificar este punto, este trabajo tuvo como propósito específico determinar el fenotipo de las células que expresan a la PPII en el hipocampo. El resultado principal de este trabajo es la demostración de que algunas de las células que expresan a la PPII en el hipocampo son de tipo GABAérgico.

Para llegar a esta conclusión se optimizaron inicialmente las condiciones para la detección por separado de ARNm de la PPII y GAD65, una enzima usada como marcador de células GABAérgicas en el cerebro. Debido a que el ARNm de la PPII es poco abundante en algunas de las subregiones del hipocampo, por ejemplo en el giro dentado, y que la expresión su expresión puede ser regulada positivamente en el eje HTP por hormonas tiroideas (Sánchez et al 2009), se analizó el efecto de la inducción del hipertiroidismo sobre la expresión de PPII en hipocampo. La distribución regional del ARNm de la PPII en ratas control o hipertiroideas, fue similar a lo reportado anteriormente (Heuer et al., 1998), lo que demuestra que el tratamiento experimental aumentó únicamente la cantidad de ARNm de la PPII observada en células preexistentes. La eficiencia del tratamiento se confirmó en la periferia, ya que se detectó una caída fuerte de los niveles séricos de TSH después de 5 días de administración de la hormona tiroidea T_3 ; esta disminución se debe a la retroalimentación negativa ejercida por el aumento en la concentración de T_3 en sangre sobre el eje HPT tanto a nivel central, en las neuronas TRHérgicas del NPV, donde se sintetiza y secreta la hormona liberadora de tiotropina (TRH), como en los tiotropos de la hipófisis anterior. Nuestros datos sugieren que además de la conocida retroalimentación negativa ejercida por las hormonas tiroideas sobre el NPV y la adenohipófisis, estas hormonas también afectan la región hipocampal. La presencia abundante de las

distintas isoformas de receptores a hormonas tiroideas en el hipocampo (Baxer et al., 2001, Ruel et al., 1985), así como la disminución en la formación de árboles dendríticos en células piramidales de ratas neonatas hipotiroideas (Rami et al., 1986) o reducción del número total de neuronas piramidales de CA3 de ratas adultas hipotiroideas (Madeira et al., 1992) o por el contrario, arborizaciones dendríticas extensas en ratas neonatas hipertiroideas (Gould y cols., 1990), sugieren que las hormonas tiroideas juegan un papel crucial en el desarrollo de la neurogénesis hipocampal. La regulación positiva sobre la expresión de la peptidasa en el hipocampo es un campo nuevo que deberá de explorarse dada la activación del sistema TRHérgico en el modelo de aprendizaje y memoria hipocampal (Aguilar et al., 2007) y su posible papel anticonvulsivo en modelos de epilepsia en donde las neuronas del giro dentado presentan una expresión abrupta de TRH (Knoblach et al., 1997).

La optimización de las condiciones para la detección por separado del ARNm de GAD65, generó una distribución de señal positiva consistente con lo publicado por otros autores (Esclapez et al., 1994), esto confirmó la especificidad de la detección en nuestras condiciones. Los ensayos de hibridación *in situ* sencilla usando la sonda GAD65 -digoxigenina dieron como resultado una distribución muy similar en todas las regiones del hipocampo analizadas, lo cuál coincide con los resultados publicados por Esclapez, et al., 1994, donde afirma que ambas isoformas de la glutamil descarboxilasa están presentes en las células GABAérgicas del hipocampo, basándonos en estos datos iniciales, nos concentramos únicamente en la detección de las células GAD65 positivas.

El hipertiroidismo tampoco cambió la cantidad de neuronas GAD65 positivas en ninguna de las subregiones hipocampales. Decidimos por lo tanto proceder al análisis de PPII, GAD65 o ambos, en los cortes de ratas hipertiroideas, por tener una mayor expresión de la enzima PPII y facilitar las observaciones. Los datos de hibridación *in situ* sencilla mostraron que el número de células que expresan a la PPII es mucho mayor que las que expresan la GAD65 en el hipocampo. Por lo tanto se vuelve evidente que la mayoría de las células que expresan a la PPII en el hipocampo no es de tipo GABAérgico. Debido a su localización se propone que el resto de las células que expresan a la PPII sean neuronas piramidales glutamatérgicas. Esta hipótesis tendrá que ser confirmada, por ejemplo en experimentos de doble hibridación *in situ*, con una sonda contra el transportador vesicular de glutamato, un marcador específico de neuronas glutamatérgicas.

Es notable que el porcentaje de células que conforman la población hipocampal GABAérgica detectada con nuestra sonda GAD65 fue significativamente menor que la población total de células que expresan a la PPII, por lo tanto, solo corresponda a una subpoblación de células PPII de origen GABAérgico, el resto es de origen aún desconocido. A nivel de cada subregión hipocampal encontramos una distribución diferencial de las células GABAérgicas, así como un porcentaje de granos de plata de PPII distinto, por célula GAD65 positiva. A pesar de que el giro dentado presentó una población significativamente más elevada de células positivas a GAD65, su índice de coexpresión con PPII (Anova, $P < 0.05$) sólo mostró diferencias significativas con respecto a las células contabilizadas en CA3 y CA4 ($*= P < 0.05$). Con respecto a CA1 y CA2, no hubo diferencias significativas en el número de células doblemente marcadas. El número de granos de plata observados dentro de las células doblemente marcadas fue de al menos 20 granos e incluso incontables en las subregiones de CA, contrario a lo observado en la región del GD, donde los granos detectados fue de 10

a 20 granos únicamente. Lo cuál nos podrían sugerir una mayor síntesis del mensajero de la PPII en las células GABAérgicas del CA1 – CA4 con respecto a la actividad transcripcional de la enzima en las células GABAérgicas del giro dentado (esta información se muestra únicamente en imágenes).

Por otro lado, los experimentos de hibridación *in situ* doble confirmaron nuestra hipótesis. Una pequeña fracción de las células que expresan a la PPII es de tipo GABAérgico en todas las regiones del hipocampo. Esta es la primera información sobre el fenotipo de las neuronas que expresan la PPII en el sistema nervioso central. Este dato es relevante debido a que uno de los efectos del TRH en el hipocampo es la inducción de la liberación del neurotransmisor inhibitorio GABA (Atzori, M., Nistri, A., 1996, Stocca., Nistri., 1996). De acuerdo a esta evidencia, uno pudiera inferir que la PPII modula la eficacia de la TRH para inducir la liberación de GABA de las interneuronas hipocampales. Esta hipótesis pudiera ser probada funcionalmente en el futuro usando inhibidores de la actividad de la enzima PPII y midiendo si la liberación del GABA es más prolongada en estas preparaciones.

El papel del péptido TRH en el hipocampo es todavía desconocido. La información de donde proviene la TRH que se encuentra en esta región tan importante no es totalmente clara. La principal fuente de péptido es de origen intrínseco; sin embargo, proyecciones TRHérgicas llegan hacia el GD desde la corteza y son fuente extrínseca de TRH (Kubek et al., 1996). La TRH del hipocampo está relacionada con los procesos de memoria y aprendizaje. Esto se basa en el análisis del metabolismo del péptido en donde incrementos en la liberación del péptido de TRH y del ARNm de la pro-TRH, en la prueba de MWM o laberinto en agua, correlacionan con cambios en la expresión de los receptores de la TRH y PPII hipocampales (Aguilar et al., 2007). Aunado a estas modificaciones, incrementos en la expresión de BDNF y de otros moduladores (Ramírez- Amaya et al., 2001), nos indican la activación de múltiples sistemas neuronales en el proceso de aprendizaje.

Experimentos electrofisiológicos permitieron entender el efecto preciso de la TRH en el circuito hipocampal. Así, aunque la participación de la TRH en el proceso de memoria y el aprendizaje en el hipocampo es poco conocido, se sabe que tiene la habilidad de incrementar la potenciación a largo plazo (LTP) en CA3 (Ishihara et al., 1992), lo que lo correlaciona con la plasticidad sináptica de esta región. Además, regula la excitabilidad en CA1 de las neuronas piramidales por incrementos en el receptor de NMDA, componente de los potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs) glutamatérgicos (Ishihara et al., 1992). Interacciona además con la transmisión GABAérgica produciendo una disminución reversible de IPSPs (potenciales post-sinápticos inhibitorios) mediada por GABA (Stocca y Nistri, 1996).

En conjunto, estos datos sugieren un papel modulador de la TRH durante el aprendizaje, si bien los mecanismos precisos son desconocidos. Nuestros datos sugieren que una de las funciones de la PPII en este circuito pudiera ser controlar la eficacia del TRH para regular algunas interneuronas GABAérgicas. En el futuro será interesante determinar si la alteración de la expresión de la PPII en estas neuronas puede cambiar los efectos plásticos de la TRH.

Existe evidencia que indica que estos incrementos en TRH desencadenan eventos inhibitorios de los potenciales de acción de origen GABAérgico, mostrando que el efecto neuroprotector y anti-epiléptico de TRH indirecto (Jaworska -Feil et al., 1999).

El giro dentado una región muy interesante para analizar; al ser altamente susceptible de recibir señales excitatorias que pudieran causar una liberación descontrolada de glutamato al medio extracelular; estas observaciones pudieran entonces sugerirnos que el giro dentado requiere de la liberación rápida de TRH, tras un evento que pone en riesgo el buen funcionamiento del hipocampo, así como de la acción oportuna de PPII, para controlar la vida media del péptido. Al expresar menores niveles de PPII, pudiera sugerirse que el efecto de TRH es más prolongado que en cualquier otra subregión del hipocampo.

CONCLUSIÓN

Algunas de las neuronas que expresan a la PPII en el hipocampo son de tipo GABAérgico. Esto refuerza la idea que la TRH actúa sobre neuronas GABAérgicas para modular el circuito hipocampal.

PERSPECTIVAS

Analizar más profundamente el fenotipo de las neuronas GABAérgicas que expresan a la PPII; en particular determinar si expresan alguno de los receptor de la TRH, para entender si existe cercanía entre los sitios de acción e inactivación en esta estructura a través de ensayos de doble o triple hibridación *in situ*, hibridación combinada a inmunohistoquímica, o doble inmunohistoquímica.

- Determinar si las neuronas no identificadas en este estudio que expresan a la PPII en el hipocampo son del tipo glutamatérgico.
- Definir si las células que expresan a la PPII son neuronas o glías

REFERENCIAS

- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., García-Vazquez, A., Ramírez- Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., y Joseph- Bravo, P. 2007. The expression of TRH, its receptors and degradindg enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochemistry International*. 50: 404-417
- Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Assenmacher, I., y Astier, H. 1983. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology*. 37: 225-228
- Aratán, S., Schafmann, R., Lechan, R. M. 1990. Pro-TRH gene expression by fetal pancreatic islets in culture. *Biochem Biophysics Res Commun*. 168: 952-958
- Atzori, M., Nistri, A. 1996. Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone on GABAergic Synaptic Transmission of the Rat Hippocampus. *European Journal of Neuroscience*. 8: 1299-1305
- Bauer, K. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochem Biophysics Res Commun*. 70: 69-74
- Bauer, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M y Deneff, C. 1990. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipophyseal cells. *Endocrinology*. 127(3): 1224-1233
- Boler, J., Enzmann, K; Bowers, C. Y., y Schally, A. V. 1969. The identity of chemical and hormonal properties of Thyrotropin-Releasing Hormone and piroglutamyl-histidil-proline-amide. *Biochem Biophysics Res Commun*. 37: 705-710
- Bowers, G., Cullinan, W.E., y Herman, J.P. 1998. Region-Specific Regulation of Glutamic Acid Descarboxilase (GAD) mRNA Expression in Central Stress Circuits. *The Journal of Neuroscience*. 18(15): 5938-5947
- Cernel, N. E., Feng, P., Kim, N. E., y Wilber, J. F. 1992. Pre-pro-thyrotropin-Releasing Hormone mRNA and TRH are present in the rat heart. *Neuropeptides*. 22: 209-212
- Charli, J.L., Vargas, M.A., Cisneros, M., de Gortari, P., Baeza, M.A., Jasso, P., Bourdais, J., Pérez, L., Uribe, R.M., y Joseph-Bravo, P. 1998. TRH inactivation in the extracellular compartment: Role of Pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6: 45-57
- Charli, J.L., Méndez, M., Vargas, M.A., Cisneros, M., Assai, M., Joseph-Bravo, P., y Wilk, S. 1989. Pyroglutamil peptidase II inhibition specifically increases recovery of THR released from rat brain slices. *Neuropeptides*. 14: 191-196
- Charli, J.L., Pascual, I., Cruz, R., y Vargas, M.A. 2006. Post-secretory inactivation of peptides in the hypothalamic-adenohypophyseal axis. Focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin-releasing hormone inactivating ectoenzyme. *Molecular Endocrinology*. 39-64

- Chávez-Gutierrez, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M.A., Matta-Camacho, E., Ducancel, F., Segovia, L., Joseph-Bravo, P., y Charli, J.L. 2005. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extensión has dominant-negative activity. *Journal of Neurochemistry*. 92: 807-817
- Cruz, R., Vargas, M.A., Uribe, R.M., Pascual, I., Lazcano, I., Yiotakis, A., Matziari, M., Joseph-Bravo, P., y Charli, J.L. 2008. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 29: 1953-1964
- Cummins, P., O'Connor, B. 1998. Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three know enzymatic forms. *Biochem Biophysics Acta*. 1429: 1-17
- De Gortari, P., Uribe, R.M., García-Vazquez, A., Aguilar-Valles, A., Martínez, A., Valdés, A., Charli, J.L., Fernández-Guardiola, A., y Joseph-Bravo, P. 2006. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochemistry International*. 48: 31-42
- De Gortari, P., Fernández-Guardiola, A., Martínez, A., Cisneros, M., y Joseph-Bravo, P. 1995. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Research*. 679: 144-150
- Deng, P.Y., Porter, J.E., Shin, H.S., y Lei, S., 2006. Thyrotropin-releasing hormone increases GABA release in rat hippocampus. *Journal Physiology*. 577.2: 497-511
- Erlander, M. G., Tobin, A. J. 1991. The estructural and functional heterogeneity of glutamic acid descarboxylase: a review. *Neurochem. Res*. 16: 215-226
- Erlander, M. G., Tillakaratne, N. J. K., Feldblum, S., Patel, N., y Tobin, A. J. 1991. Two genes encode distinct glutamate descarboxylases. *Neuron*. 7: 91-100
- Esclapez, M., Tillakaratne, N., Kaufman, D.L., y Tobin, A.J. 1994. Comparative Localization of Two Forms of Glutamic Acid Descarboxilase and Their mRNAs in Rat Brain Supports the Concept of Functional Differences between the Forms. *The Journal of Neuroscience*. 14(3): 1834-1855
- Feng, P., Glu, J., Kim, U. J., Carnell, N. E., y Wilber, J. F. 1993. Identification and localization and developmental studies of rat Pre-pro Thyrotropin-Releasing Hormone mRNA in the testis. *Neuropeptides*. 24: 63-69
- Friedman, T.C., y Peng-Loh, Y., Cawley, N.X., Birch, N.P., Huang, S.S., Jackson, V.M.D., y Nillni, A.E. 1995. Processing of Pro-thyrotropin-Releasing Hormone (Pro-TRH) by Bovine Intermediate Lobe Secretory Vesicle Membrane PC1 y PC2 Enzymes. *Endocrinology*. 136(10): 4462-447
- Griffiths, E. C., y Bennett, J.R. Eds. 1983. Thyrotropin –Releasing Hormone. Raven press, N.Y.
- Gutierrez-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

- Heuer, H., Ehrchen, J., Bauer, K., y Schäfer, M.K.H. 1998. Region-specific expression of thyrotrophin-releasing-hormone-degrading-ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *European Journal of Neuroscience*. 10: 1465-1478
- Houser, C.R., y Esclapez, M. 1994. Localization of mRNAs Encoding Two Forms of Glutamic Acid Descarboxilase in the Rat Hippocampal Formation. *Hippocampus*. 4(5): 530-545
- Hsieh, K. P., y Martin, T. F.1992. Thyrotrophin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins G_q y G₁₁. *Molecular Endocrinology*. 6: 1673-1681
- Itadani, H., Nakamura, T., Itoh, J., Iwaasa, H, Kanatani, A., Borkowski, J. 1998. Cloning and characterization of a new type of thyrotrophin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 250: 68-71
- Jaworska-Feil, L., Turchan, J., Przewłocka, B., Budziszewska, B., Leśkiewicz, M., y Lasoń, W. 1999. Effects of pilocarpine- and kainate- induced seizures on thyrotrophin-releasing hormone biosynthesis and receptors in the rat brain. *J. Neural Transm*. 106: 395-407
- Joseph-Bravo, P., Uribe, R.M., Vargas, M.A., Pérez-Martínez, L., Zoeller, T., y Charli, J.L. 1998. Multifactorial Modulation of TRH Metabolism. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 18(2): 231-247
- Kelly, J., Slator, G., Tipton, K., Williams, C., Bauer, K. 2000. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotrophin-releasing- hormone-degrading ectoenzyme for thyrotrophin- releasing- hormone- like peptides. *J. Biol. Chem*. 275: 16746- 16751
- Knoblach, S.M., y Kubek, M.J. 1997. Changes in thyrotrophin-releasing hormone levels in hippocampal subregions induced by a model of human temporal lobe epilepsy: Effect of partial and complete kindling. *Neuroscience*. 76: 97-104
- Knoblach, S.M., y Kubek, M.J. 1997. Increases in thyrotrophin-releasing hormone messenger RNA expression induced by a model of human temporal lobe epilepsy: Effect of partial and complete kindling. *Neuroscience*. 76: 85-95
- Kubek, M. J., Knoblach, S. M., Sharif, N. A., Burt, D. R., Buterbaugh, G. G., Fuson, K. S. 1993. Thyrotrophin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann. Neurol*. 33: 70-76
- Lazcano, I., Uribe, R. M., Martínez-Chávez, E., Vargas M. A., Matzari, M., Joseph-Bravo, P y Charli, J. L. 2012. Pyroglutamyl Peptidase II Inhibition Enhances the Analeptic Effect of Thyrotrophin-Releasing Hormone in the Rat Medial Septum. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 342: 222-231
- Lee, S.L., Stewart, K., y Goodman, R.H. 1988. Structure of the gene encoding rat thyrotrophin releasing hormone. *J. B. C*. 263: 16604-16609
- Lechan, R. M., Jackson, I. M. D. 1982. Immunohistochemical localization of thyrotrophin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*. 111: 55-65

- Méndez, C., Cruz, C., Joseph-Bravo, P., Wilk, S., y Charli, J. L. 1990. Evaluation of the Role of Prolyl Endopeptidase and Pyroglutamyl Peptidase I in the Metabolism of LHRH and TRH in Brain. *Neuropeptides*. 17: 55-62
- Nillni, E., Sevarino, K. 1999. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone derived peptides. *Endocrine Rev.* 20: 599- 648
- Nillni, E. 2010. Regulation of the hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31: 134- 156
- O'Leary, R., O'Connor, B. 1995. Thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurochemistry*. 65: 953-963
- Pérez-Martínez, L., Charli, J.L., y Joseph-Bravo, P. 2001. Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Developmental Brain Research*. 130: 73-81
- Ponce, G., Charli, J.L., Pasten, J.A., Aceves, C y Joseph-Bravo, P. 1988. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology*. 48(2): 211-213
- Rosen, J., Abramowitz, J., y Post, R. 1993. Colocalization of TRH mRNA and Fos-like Immunoreactivity in Limbic Structures Following Amigdala Kindling. *Molecular and Cellular Neurosciences* 4: 335-342
- Sánchez, E., Charli, J.L., Morales, C., Corkidi, G., Seidah, N.G., Joseph-Bravo, P., y Uribe, R.M. 1997. Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin-releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Research*. 761: 77-86
- Sánchez, E., Vargas, M.A., Singru, P.S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J.L., y Lechan, R.M. 2009. Tanycyte Pyroglutamyl Peptidase II Contributes to Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis through Glial-Axonal Associations in the Median Eminence. *Endocrinology*. 150: 2283-2291
- Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J., and Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 9534-9538.
- Suen, C. S y Wilk, S. 1989. Regulation of Thyrotropin Releasing Hormone Degrading Enzymes in Rat Brain and Pituitary by L- 3,5,3'-Triiodothyronine. *Journal of Neurochemistry*. 52(3): 884-888
- Stocca, G., Nistri, A. 1996. The Neuropeptide Thyrotropin-Releasing Hormone Modulates GABAergic Synaptic Transmission on Pyramidal Neurones of the Rat Hippocampal Slice. *Peptides*. 17: 1197-1202
- T. Szilágyi, K., Orbán-Kis., Emőke Horváth., Júlia Metz., Zsuzsanna Pap y Z. Pávai. 2011. Morphological identification of neuron types in the rat hippocampus. *Rom J Morphol Embryol*. 52(1): 15-20
- Uribe, R.M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Méndez, M., Covarrubias, L., y Charli, J.L. 1991. Some Events of Thyrotropin-Releasing Hormone Metabolism Are Regulated in Lactating and Cycling Rats. *Neuroendocrinology*. 54: 493-498
- van Strien, M.N., Cappaert, N.L.M and Witter, M.P. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nature reviews*. 10: 272-282

- Vargas, M.A., Uribe, R.M., Cisneros, M., Romero, F., González, S., Joseph-Bravo, P., y Charli, J.L. 2002. Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohypophysis. *European Journal of Endocrinology*. 147: 363-369
- Yamada, M., Radovick, S., Wondisford, F.E., Nakayama, Y., Weintraub, B. D., y Wilber, J. F. 1990. Cloning and Structure of Human Genomic DNA and Hypothalamic cDNA Encoding Human Prepro-Thyrotropin-Releasing Hormone. *Molecular Endocrinology*. 4: 551-556.

ANEXOS

Anexo 1. Transformación de plásmidos y purificación del ADN

a) Transformación de *E. coli* DH5 - α con electroporación

Para lograr obtener un alto número de copias de los plásmidos PPII y GAD, se transformó a *E. coli* cepa DH5- α , mediante electroporación de cada plásmido. Se descongelaron sobre hielo las células de *E. coli* electrocompetentes y se mezclaron con 100 ng de plásmido. Se transfirió la mezcla a una celda de electroporación y se transformó con un choque eléctrico. Se transfirieron las células transformadas a un tubo con 1 ml con medio LB estéril (sin ampicilina) y se dejaron incubando por 1 hora a 37°C a 200 rpm's.

Se plaquearon 50 μ l de cultivo con células transformadas en cajas de agar con 1 μ l de ampicilina (200mg/ml) por cada 1 ml de medio LB, se dejaron crecer por 12 horas a 37°C. Para generar una concentración de 20 μ g de cada plásmido, se inoculó un cultivo de 5 ml de LB + 5 μ l de ampicilina (200 μ g/ml) con un raspado de una colonia crecida en placa de agar, se dejó incubando por 12 horas a 37°C a 200 rpm's.

b) Purificación del ADN con Miniprep QIAGEN

La purificación del ADN se realizó mediante el protocolo de purificación por columna de QIAGEN. Se centrifugaron los 5 ml del cultivo de células transformadas a 7,000 rpm's durante 10 minutos a T°A en un tubo eppendor y el pellet fue resuspendido en 250 μ l de *buffer* de dilución P1 que contenía ARNasa A (7,000 U/ml). Se agregaron 250 μ l de *buffer* de lisis P2 y se mezcló invirtiendo los tubos de 4 a 6 veces y se dejaron en esta solución por 5 minutos, se añadieron 350 μ l de *buffer* de neutralización N3 e inmediatamente se mezcló por inversión del tubo de 4 a 6 veces y se mantuvieron en hielo por 5 minutos antes de centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm's en microcentrifuga. El sobrenadante se transfirió a una columna QIAprep y fue centrifugada de 30 a 60 segundos a 13,000 rpm's en microcentrifuga. Se agregaron 0.5 ml de *buffer* PB y se centrifugó de 30 a 60s a 13,000 rpm's como en el paso anterior. La columna fue lavada con 0.75 ml de *buffer* PE y centrifugada de 30 a 60s. Después de eliminar el eflujo, se procedió a dar 1 minuto adicional de centrifugación para remover el *buffer* restante. Para eluir el ADN de la columna QIAprep se agregaron 50 μ l de *buffer* EB o H₂O y se dejó reposando por 1 minuto; finalmente se centrifugó 1 minuto adicional y el ADN se guardó a -20°C.

Anexo 2. Transcripción In vitro con ³⁵S α -UTP

a) Determinación de la actividad específica del ³⁵S α -UTP

La actividad específica de azufre 35 debe ser calculada justo al momento de usar, para conocer la cantidad exacta de μ Ci que se emplearan en la transcripción *in vitro* de acuerdo al porcentaje de decaimiento de la sonda al día de uso.

La fórmula que empleada para obtener el porcentaje de actividad de cualquier isótopo es la siguiente:

$$\frac{Df}{1/SA \text{ (calculada)} - 1 - DF / SA \text{ (teórica)}}$$

- Donde Df, es la fracción de decaimiento de la actividad del isótopo radioactivo al día de su uso (puede ser calculado con la tabla de decaimiento del ^{35}S PACKARD)
- SA calculada, es la actividad específica al momento del empacamiento y ya viene dada por el proveedor y es igual a $1/SA$ calculada - (1- Df)
- SA teórica, es la actividad específica calculada para el azúfre
- La vida media del ^{35}S es de 87.4 días (tiempo que tarda en decaer al 50% su actividad específica)
- De acuerdo al porcentaje de decaimiento se puede calcular la cantidad de μCi en la muestra.

b) Determinación del porcentaje de incorporación del nucleótido ^{35}S α -UTP posterior al ensayo de transcripción *in vitro*

Para determinar el porcentaje de incorporación del nucleótido ^{35}S α -UTP al transcrito, inmediatamente después de agregar la solución ribostop en la transcripción *in vitro*, se tomó una alícuota de 1 μl del tubo de reacción y se le adicionaron 24 μl de solución precipitadora (EDTA 10 mM, SDS 1%, ARNt 0.5 mg/ml). Se colocaron 5 μl de esta mezcla a 4 cuadritos de 1 cm^2 de papel de intercambio iónico (DEAE 81 Whatman). Dos de estos papeles con marca no llevaron ningún lavado; a los otros dos se les realizaron los siguientes lavados:

- 5 lavados con *buffer* fosfato de sodio dibásico-anhidro (Na_2HPO_4) de 5 minutos cada uno a T°A
- 1 lavado con H_2O - miliQ por 1 minuto a T°A
- 1 lavado en etanol al 100% por 1 minuto a T°A

Los papeles marcados que fueron lavados, se pusieron a secar sobre una placa de unicel, atravesados por alfileres por 10 minutos a T°A. Finalmente todos los papeles marcados se metieron por separado en viales con 5 ml de líquido de centelleo (PPO 0.08%, POPOP 0.01% en tolueno) y la incorporación de la marca al transcrito fue determinada en un de emisiones β (cantidad de radiación en cpm's). La actividad específica es la relación de cpm's incorporados (corregidos por el factor de dilución) entre la cantidad de ARNc sintetizado. La actividad específica de la sonda PPII utilizada en este estudio fué de 1,300,520 cpm's/ μg .

Anexo 3. Transcripción In vitro con 11 UTP -digoxigenina

a) Detección de la incorporación de la digoxigenina 11 α -UTP al transcrito durante la transcripción *in vitro*

Para determinar la eficiencia de unión de la digoxigenina 11 α -UTP, el transcrito fue analizado por electroforesis en un gel de acrilamida al 6% en condiciones desnaturalizantes. Se usó TBE 1X, 10 μ l de TEMED y 100 μ l de persulfato de amonio al 10% para inducir la polimerización de la acrilamida. Se usó 1 μ l del transcrito que fue desnaturalizado por 15 minutos a 65°C e inmediatamente colocado en hielo antes de cargar al gel; después de correr durante 1 hora a 400 volts la muestra, se realizó la transferencia del transcrito marcado a una membrana de nylon (marca Schleider & Schuell, BioScience) usando papeles Wattman de 3 mm, mojados en soluciones ánodo 1 (Tris 0.3 M pH 10.4 + metanol al 20%), ánodo 2 (Tris 25 mM pH 10.4 + metanol al 20%) y cátodo (2.62g de ácido caprónico en 500 ml de H₂O- miliQ, pH 9.4), en una cámara *Semi-dry Blotting* a 45 amperes durante 45 min. Las muestras fueron fijadas a la membrana de nylon con luz UV (1,200 Joules) durante 3 minutos.

La detección del transcrito marcado se hizo empleando un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, para lo cual la membrana de nylon fué lavada en *buffer B* (Tris HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) durante 5 minutos a T°A, por 10 minutos en solución blocking 5%/ PBS 1X a T°A e incubada con anti-digoxigenina acoplada a fosfatasa alcalina 1:5000 diluida en *buffer A* de dilución de anticuerpo (Tris HCl 100mM pH 7.6, NaCl 100 mM + Tritón 0.3%, BSA 1%) durante 5 minutos a T°A. Por último se realizó 1 lavado de 5 minutos a T°A en *buffer B* y se reveló con 45 μ l de NBT, 35 μ l X-P por cada 10 ml de *buffer B*, agitando en la oscuridad hasta que aparecieron las bandas en la membrana. La reacción fué detenida en *buffer B*.

b) Hidrólisis alcalina de la sonda GAD65 digoxigenina 11 α -UTP por el método de buffer de carbonatos

El tamaño de las sondas de GAD65 es relativamente grande, por lo que se redujo su tamaño a fragmentos cortos de aproximadamente 100 pb, para facilitar la penetración en los tejidos. El tiempo de la reacción de hidrólisis fue determinado por la fórmula $t = (L_0 - L_f) / kL_0L_f$

Donde t es el tiempo de reacción en minutos

L₀ es el tamaño inicial de la sonda (en Kb)

L_f es el tamaño de la sonda final

k es la constante de hidrólisis (0.11 *cuts*/Kb/min)

Se tomaron 20 μ l del transcrito marcado a los cuales se les adicionaron 20 μ l de H₂O-ISH y 40 μ l de *buffer* de carbonatos (Na₂CO₃ 0.06 M, NaHCO₃ 0.04 M pH 10.2). El tubo con la reacción se dejó a 60°C durante el tiempo determinado con la fórmula. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se detuvo la reacción colocando el tubo en hielo y adicionando inmediatamente 80 μ l de *buffer* de neutralización (NaOAc 0.2 M pH 4, ácido acético al 1%, ajustando a pH 6 con H₂O-ISH) + 5 μ l de ARNt 10mg/ml y 240 μ l de etanol absoluto

frio. Se dejó precipitando durante 1 hora a -70°C y el transcrito fue recuperado por centrifugación a 13,500 rpm's, durante 30 minutos a 4°C , se aspiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla durante 10 minutos a $T^{\circ}\text{A}$, finalmente se resuspendió el transcrito marcado e hidrolizado en 50 μl de H_2O -ISH.

Anexo 4. Preparación de los tejidos para su posterior análisis a nivel celular

a) Emulsión de los tejidos

Al terminar el tren de lavados con etanol, se pusieron a secar las laminillas en *rafts* antes de recubrir con la emulsión fotográfica. En una caja por separado se guardaron laminillas extras para realizar pruebas de revelado. Todos los pasos de emulsión y revelado de las laminillas se hicieron en un cuarto oscuro para no velar la emulsión fotográfica y con sistema de aire acondicionado a 17°C .

La emulsión fotográfica (NTB Kodak) fué diluida 1:1 en agua desionizada y fundida a dentro de un baño de 45°C por 20 minutos, hasta obtener una consistencia gelatinosa. Posteriormente se vertió la emulsión en una copa de vidrio donde se introdujeron las laminillas una a una para cubrir por completo los tejidos con la emulsión fotográfica, se evitó en todo momento la formación de burbujas. Las laminillas emulsionadas se dejaron secando por 3 horas a 17°C y se colocaron en cámaras oscuras de hibridación junto con cápsulas de sílica gel previamente deshidratadas, las cajas fueron selladas perfectamente con cinta adhesiva y se guardaron a 4°C dentro de bolsas negras que también contenían sílica gel deshidratada. El tiempo de exposición para la PPII fue de 30 a 40 días (el tiempo de exposición depende del isótopo utilizado y de la concentración de ARNm de la sonda utilizada en los tejidos hibridados).

b) Revelado de la emulsión

Durante el tiempo de exposición a la emulsión fotográfica, se revelaron algunas laminillas de prueba para detectar el tiempo óptimo de revelado de las laminillas experimentales simples y dobles.

El revelado de la emulsión se realizó haciendo lavados en las siguientes soluciones en completa oscuridad (todas las soluciones estuvieron a una temperatura de $13\text{-}14^{\circ}\text{C}$):

- 1 lavado en Revelador D19 (Kodak, 607g/3.8L) por 2 minutos y 40 segundos (el revelador se preparó en agua destilada a 52°C en la oscuridad).
- 1 lavado en H_2O - Ac. Acético al 2% por 40 segundos
- 1 lavado en fijador GBX de 2 minutos
- 1 lavado en fijador GBX de 2 min con luz roja de seguridad y 4 minutos con luz blanca

Se dejaron en H_2O destilada por 15 minutos con movimientos suaves y se eliminó de la parte trasera de cada laminilla el exceso de emulsión con ayuda de una navaja, sin rayar las laminillas. Antes de montar los tejidos se deshidrataron realizando un tren de lavados de 3 minutos en etanol en el siguiente orden: 70%, 80%, 95%, 100% y 100%. Finalmente se hicieron 2 lavados en xilol de 3 minutos cada uno.

c) Montaje de los tejidos

Los tejidos fueron cubiertos con un cubreobjetos y medio de montaje (marca Cristal Mount aqueous mounting médium, Sigma) después del proceso de deshidratación. Se dejaron secar colocándo las laminillas de forma horizontal sobre una rejilla, dentro de una campana de extracción por 12 horas antes de su manipulación.

Anexo 5. Tinciones

a) Tinción de violeta de cresilo

Se les agregó una gota del colorante violeta de cresilo (marca Sigma) al 1% sobre los tejidos durante 1 minuto, para eliminar el exceso de colorante se hizo un lavado con etanol al 96% y se deshidrataron los tejidos por 40 segundos en etanol absoluto. Se dieron 3 lavados rápidos en xilol y finalmente se colocó 1 gota de resina para montar (marca Cristal Mount aqueous mounting médium, Sigma) antes de colocar el cubreobjetos, con delizadeza para no permitir la formación de burbujas. El secado de las laminillas se hizo colocándolas en forma horizontal sobre una rejilla dentro de una campana de extracción por 12 horas antes de su manipulación.

