



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DE LA VÍA DEL AMP<sub>c</sub> EN LA EXPRESIÓN DE TRH DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR HIPOTALÁMICO Y NÚCLEO ACCUMBENS Y SU RELACIÓN CON LA CONDUCTA ALIMENTARIA Y DE ANSIEDAD.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
MARIANA ISABEL VALDÉS MORENO

TUTOR PRINCIPAL: DRA. PATRICIA BERTHA JUDITH DE GORTARI  
GALLARDO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS,  
UNAM.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. JESÚS JAVIER ESPINOSA AGUIRRE, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
BIOMÉDICAS, UNAM.  
DRA. NIMBE TORRES Y TORRES, PROGRAMA DE MAESTRÍA Y  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, UNAM

MÉXICO, D. F. Octubre, 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ÍNDICE

I. ABREVIATURAS.....	1
II. RESUMEN.....	3
III. INTRODUCCIÓN.....	5
1. TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina).....	5
1. 1 Receptores de TRH (TRH-Rs).....	6
1. 2 Función neuroendócrina de TRH.....	7
1. 3 Funciones no hipofisiotrópicas de TRH.....	8
1. 3. 1 TRH como anorexigénico.....	9
1. 3. 2 TRH y otros neurotransmisores.....	10
1. 3. 3 TRH como modulador del estado de ánimo.....	11
1. 4 Regulación de la expresión TRH.....	12
1.4. 1 Relevancia de las PDEs en las cascadas de señalización intracelular.....	14
1. 4. 2 Efecto del estado nutricional en la expresión de TRH.....	15
2. TRH en un modelo de AN.....	16
2. 1 Modelo animal de anorexia inducida por deshidratación (AID).....	17
3. N. Acc y ansiedad.....	20
IV. JUSTIFICACIÓN.....	21
V. HIPÓTESIS.....	22
VI. OBJETIVO PRINCIPAL.....	22
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	22
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	23
1. Determinación de la dosis efectiva de inhibidor de PDE7 con efecto ansiolítico administrado vía i.p en animales control.....	23
2. Determinación de la dosis efectiva de inhibidor de PDE7B con efecto ansiolítico administrado intra N. Acc.....	24
3. Efecto conductual de la inyección de TRH intra N. Acc.....	25

4. Modelo de AID e inyección i.p del inhibidor. ....	26
5. Análisis de la prueba de ED. ....	27
6. Disección de las regiones cerebrales de interés: N. Acc y NPV. ....	28
7. Extracción del RNA total por el método de tiocianato de guanidina. ....	28
7. 1 Lectura del RNA total. ....	29
7. 2 Integridad del RNA. ....	30
7. 3 Transcripción del RNA total a DNAc. ....	30
7. 4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	30
8. Determinación del contenido de pCREB por Western Blot. ....	32
8. 1 Preparación de los homogenados. ....	32
8. 2 Determinación de proteínas por el método de Lowry. ....	33
8. 3 Preparación de los geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS). ....	33
8. 4 Electroforesis. ....	34
8. 5 Transferencia. ....	34
8. 6 Anticuerpos. ....	35
8. 7 Revelado. ....	36
8. 8 Stripping. ....	36
8. 9 Análisis de las placas. ....	37
9. Análisis estadísticos ....	37
IX. RESULTADOS. ....	38
El inhibidor de PDE7B tiene efecto ansiolítico a dosis de 2 mg/Kg, i.p. ....	38
La disminución en el tiempo de enterramiento coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc. ....	39
El efecto ansiolítico del inhibidor dura hasta 24 horas. ....	40
La disminución en el tiempo de enterramiento coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc., 30 minutos y una hora después de administrar el inhibidor. ....	41

La administración de inhibidor de PDE7B en el N. Acc aumenta la expresión del RNAm de TRH en esa región.....	42
La administración del inhibidor de PDE7B en el N. Acc disminuye el tiempo de enterramiento.....	43
La administración del inhibidor de PDE7B en el N. Acc también aumenta la expresión del RNAm de TRH en el NPV.....	44
Inyección de TRH intra N. Acc. ....	45
Modelo de AID. ....	46
El consumo de alimento y el peso corporal disminuyen significativamente en el modelo de AID.....	46
La dosis baja de inhibidor (0.2 mg/Kg, i.p) disminuye el consumo de alimento en animales control. ....	48
La disminución en el consumo de alimento en animales control coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el NPV, semejándose al modelo de AID.....	49
Una dosis mayor de inhibidor (2mg/Kg) no modifica el consumo de alimento en animales control pero lo aumenta en animales AID.....	50
La expresión de D2 en el hipotálamo aumenta por la inhibición de PDE7 (2 mg/Kg, i.p).....	52
La dosis baja de inhibidor (0.2 mg/Kg) disminuye el tiempo de enterramiento en animales AID pero no en animales control.....	53
La dosis alta de inhibidor (2 mg/Kg) disminuye el tiempo de enterramiento en animales control y AID; en animales control este cambio coincide con un aumento en la expresión de TRH en el N. Acc.....	54
X. DISCUSIÓN. ....	56
Curva dosis respuesta y curso temporal.....	56
Administración del inhibidor y de TRH intra N. Acc.....	58
Evaluación de la conducta alimentaria tras la aplicación del inhibidor de PDE7 en animales control y en un modelo de anorexia.....	59

Efecto de diferentes dosis de inhibidor de PDE7 sobre la expresión de TRH en N. Acc, NPV y sobre las conductas de ansiedad y alimentaria.....	60
Controles .....	60
Conducta alimentaria.....	60
Conducta de ansiedad.....	62
Modelo de AID.....	64
Conducta alimentaria.....	64
Conducta de ansiedad. ....	65
XI. CONCLUSIONES. ....	66
XII. REFERENCIAS.....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Estructura de TRH. ....	6
Figura 2. El eje HHT se regula por retroalimentación negativa.....	8
Figura 3. Diferentes cascadas de señalización intracelular pueden fosforilar a CREB.....	13
Figura 4. Micrografías en campo oscuro de muestras representativas del mRNA de pro-TRH en NPV.....	18
Gráfica 1. El inhibidor de PDE7B tiene efecto ansiolítico a dosis de 2 mg/Kg, i.p.....	39
Gráfica 2. La disminución en el tiempo de enterramiento coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc.....	40
Gráfica 3. El efecto ansiolítico del inhibidor dura hasta 24 horas.....	41
Gráfica 4. La disminución en el tiempo de enterramiento coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc., 30 minutos y una hora después de administrar el inhibidor.....	42
Gráfica 5. La administración de inhibidor de PDE7B en el N. Acc aumenta la expresión del RNAm de TRH en esa región.....	43
Gráfica 6. La administración del inhibidor de PDE7B en el N. Acc disminuye el tiempo de enterramiento.....	44

Gráfica 7. La administración del inhibidor de PDE7B en el N. Acc también aumenta la expresión del RNAm de TRH en el NPV.....	45
Gráfica 8. Inyección de TRH intra N. Acc.....	46
Modelo de AID.	
Gráficas 9 y 10. El consumo de alimento y el peso corporal disminuyen significativamente en el modelo de AID.....	47, 48
Gráfica 11. La dosis baja de inhibidor (0.2 mg/Kg, i.p) disminuye el consumo de alimento en animales control.....	49
Gráfica 12. La disminución en el consumo de alimento en animales control coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el NPV, semejándose al modelo de AID.....	50
Gráfica 13. Una dosis mayor de inhibidor (2mg/Kg) no modifica el consumo de alimento en animales control pero lo aumenta en animales AID.....	51
Gráfica 14. La expresión de D2 en el hipotálamo aumenta por la inhibición de PDE7 (2 mg/Kg, i.p).....	52
Gráfica 15. La dosis baja de inhibidor (0.2 mg/Kg) disminuye el tiempo de enterramiento en animales AID pero no en animales control.....	53
Gráfica 16. La dosis alta de inhibidor (2 mg/Kg) disminuye el tiempo de enterramiento en animales control y AID; en animales control este cambio coincide con un aumento en la expresión de TRH en el N. Acc.....	55

## I. ABREVIATURAS

AC Adenilciclase

AgRP Proteína relacionada al agouti

AID+I Grupo de anorexia inducida por deshidratación inyectado con inhibidor de fosfodiesterasa 7B

AID Anorexia inducida por deshidratación

AMPc Adenosín monofosfato cíclico

AN Anorexia nerviosa

ANOVA Análisis de varianza

ARC Núcleo arcuato hipotalámico

ATV Área tegmental ventral

BRL-50481 Inhibidor de fosfodiesterasa 7

C+I Grupo control inyectado con inhibidor de fosfodiesterasa 7

CART Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas

CRE Elemento de respuesta a CREB

CREB Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

DA Dopamina

D2 Desyodasa 2

ED Enterramiento defensivo

EEM Error estándar de la media

EM Eminencia media

GPCR Receptor acoplado a proteína G



HHT Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides

HT Hormonas tiroideas

i.c.v Intra cerebro ventricular

i.p Intraperitoneal

N. Acc Núcleo accumbens

NPV Núcleo paraventricular hipotalámico

NPVa Núcleo paraventricular hipotalámico anterior

NPVc Núcleo paraventricular hipotalámico caudal

NPY Neuropéptido Y

pCREB Fosfo CREB

PDE, PDE7B Fosfodiesterasa, fosfodiesterasa 7B

PKA Proteína cinasa dependiente de AMPc

POMC Pro-opiomelanocortina

RNAm Ácido ribonucleico mensajero

SNC Sistema Nervioso Central

T<sub>3</sub> Triyodotironina

T<sub>4</sub> Tiroxina

TR Receptor nuclear a hormona tiroidea

TRE Elemento de respuesta al receptor nuclear de hormona tiroidea

TRH Hormona liberadora de tiotropina

TRH-R1, TRH-R2 Receptor nuclear a hormona liberadora de tiotropina, tipo 1 y tipo 2

TSH Hormona estimulante de la tiroides

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

## II. RESUMEN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un péptido con función hipofisiotrópica que estimula la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides; sin embargo, TRH también parece actuar como neuromodulador en regiones del sistema límbico, probablemente al afectar la liberación de neurotransmisores inhibitorios y excitatorios, por lo que se ha propuesto que su actividad como neuromodulador es estado-dependiente. A TRH también se le considera anorexigénico y ansiolítico cuando es administrado de manera central en animales. TRH está involucrado en el despliegue de la conducta de anorexia en un modelo animal de anorexia nerviosa (AN) denominado “anorexia inducida por deshidratación (AID)”, en el que las ratas reciben como agua de bebida una solución de NaCl al 2.5% a lo largo de 5 días y disminuyen significativamente su consumo de alimento y peso corporal. Estos animales presentan un aumento en la expresión de TRH en la subdivisión anterior del núcleo paraventricular hipotalámico (NPVa) que no tiene función hipofisiotrópica, por lo que es probable que este TRH al actuar en otras regiones cerebrales, esté involucrado en componentes de la conducta alimentaria como la integración del estado emocional y la motivación por el consumo de alimento. Una de tales regiones podría ser el núcleo accumbens (N. Acc) ya que durante el modelo de AID, esta región presenta un aumento en la expresión de TRH y una disminución en el contenido del péptido, sugiriendo que la vía TRHérgica de esta región está activa. Los animales AID también se encuentran significativamente más ansiosos que el grupo control, lo cual coincide con la elevada comorbilidad entre trastornos de ansiedad y AN. La expresión de TRH puede aumentar por la unión de pCREB (fosfo-proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc) a su promotor, por lo que la estimulación de una cascada de señalización que promueva la fosforilación de CREB, como la del AMPc, podría también aumentar la expresión de TRH. El objetivo general de este trabajo fue evaluar la expresión de TRH en el NPV y N. Acc y su asociación con el consumo de alimento y la ansiedad (en la prueba de enterramiento defensivo), respectivamente, en animales control y AID inyectados de forma aguda con vehículo o con un inhibidor de la fosfodiesterasa 7 (PDE7), cuya isoforma PDE7B se expresa en el NPV y N. Acc. Además, la evaluación de la expresión de la enzima desyodasa 2, por estar involucrada en la expresión local hipotalámica de TRH; y para evaluar el efecto de la inhibición de PDE7B, la determinación del contenido de pCREB en las mismas regiones por Western Blot.

En animales control alimentados *ad libitum* se caracterizó la cinética del inhibidor de PDE7: la dosis de 2 mg/Kg i.p, y la de 1 µg intra N. Acc, estuvieron asociadas con ansiólisis y mayor expresión de TRH en el N. Acc; estos efectos duraron entre 30 minutos y una hora al inyectarlo i.p, y hasta 24 horas al administrarlo intra N. Acc. En el modelo de anorexia, como se esperaba, el grupo AID disminuyó su consumo de alimento y peso corporal respecto al control desde el primer y tercer día del modelo, respectivamente; además presentó una tendencia al incremento en la expresión de TRH en el NPV y un aumento en el N. Acc. En animales control inyectados con inhibidor 0.2 mg/Kg, i.p (vs control vehículo), se observó una asociación entre el aumento en la expresión de TRH en el NPV y un menor consumo de alimento, reproduciendo las características del grupo AID. La dosis de 2 mg/Kg, i.p (vs control vehículo) no redujo el consumo de alimento en animales control pero se asoció con ansiólisis y una mayor expresión de TRH en el N. Acc. El inhibidor no produjo cambios en la expresión de TRH en el NPV ni en el N. Acc de los animales AID (vs AID vehículo), sin embargo, ambas dosis de inhibidor (0.2 y 2 mg/Kg, i.p) tuvieron un efecto ansiolítico y la dosis alta pareció promover el consumo de alimento en ese grupo (vs AID vehículo). El grupo AID inyectado con inhibidor (2 mg/Kg, i.p) presentó mayor expresión de D2 en el hipotálamo (vs AID vehículo), lo cual pudo haber impedido un aumento superior de TRH en este grupo. Los resultados preliminares de Western Blot sugieren que la inhibición de PDE7B sí podría aumentar el contenido de pCREB sin embargo aún se requieren más determinaciones.

En resumen, la inhibición de PDE7 sí parece relacionarse con ansiólisis y con aumento en la expresión de TRH en el N. Acc únicamente en animales control; la ansiedad del grupo AID parece ser independiente de TRH de ese núcleo. Estos datos también podrían apuntar a una diferencia en la susceptibilidad de la vía TRHérgica del NPV y la del N. Acc ante la inhibición de la PDE7B, por lo que, al menos mediante este mecanismo, no es posible observar simultáneamente los efectos ansiolítico y anorexigénico sugeridos para TRH.

### III. INTRODUCCIÓN.

El hipotálamo es una de las regiones del sistema nervioso central (SNC) más involucradas en la homeostasis energética porque ahí se integran señales centrales y periféricas que informan sobre las reservas de energía a corto y largo plazos (1).

Las señales periféricas, constituidas por las hormonas leptina e insulina, tienen receptores en el núcleo arqueado del hipotálamo (ARC) en las neuronas que sintetizan péptidos promotores del consumo de alimento (orexigénicos), como el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado al agouti (AgRP), y en neuronas que sintetizan péptidos con el efecto contrario (anorexigénicos) como la pro-opiomelanocortina (POMC) y la hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH) (2).

Los axones de estos grupos neuronales llegan al hipotálamo lateral (HL) y/o al núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) (3) donde se sintetizan los “factores hipotalámicos”, hormonas cuya principal función es la de promover la actividad de los ejes neuroendócrinos: hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT), hipotálamo-hipófisis-glándulas adrenales (HHA) e hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG), para permitir la adaptación del individuo a los cambios en las demandas energéticas dependientes de la actividad física, el estado fisiológico, la exposición a estímulos estresantes, entre otros (4).

#### 1. TRH (Hormona Liberadora de Tirotrópina).

El eje HHT es controlado por TRH, el primer factor hipotalámico en haber sido estudiado, al inicio por su papel neuroendócrino y luego por sus funciones como neuromodulador. TRH es un tripéptido ( $p\text{Glu-His-Pro-NH}_2$ ) procesado a partir de un precursor más grande (26 kDa) denominado pre-pro-TRH (5).

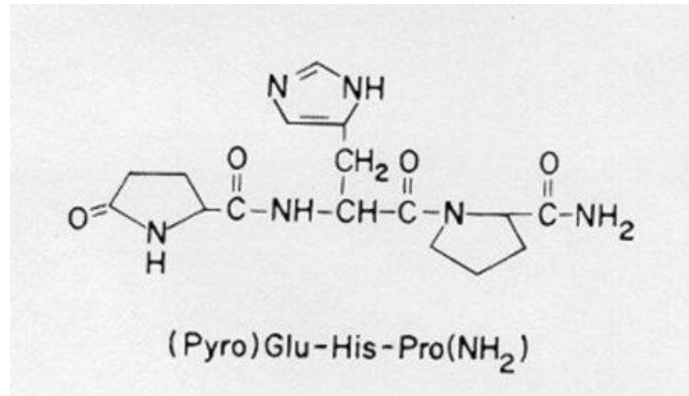


Figura 1. Estructura de TRH. Tomado de (6).

El RNAm de pro-TRH se encuentra en tejidos periféricos (células beta del páncreas, tracto gastrointestinal, sistema genito-urinario) y en diversas regiones del SNC como el hipotálamo y el núcleo accumbens (N. Acc) (7).

A nivel central, TRH actúa como neuromodulador en la mayoría de los grupos neuronales donde se expresa (8), excepto en el caso del TRH sintetizado en las “neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas” ubicadas en la subdivisión medial y periventricular del NPV, desde donde es vertido hacia la circulación portahipofisaria para actuar sobre la adenohipófisis (9, 10).

### 1. 1 Receptores de TRH (TRH-Rs).

TRH lleva a cabo sus funciones al unirse a sus receptores acoplados a proteína G (GPCR) denominados TRH-R1 y TRH-2, cuya afinidad por TRH es similar; estos receptores difieren entre sí respecto a su distribución anatómica aunque en suma, existen TRH-Rs en la mayor parte del cerebro.

TRH-R1 se expresa mayoritariamente en la adenohipófisis y en otras regiones neuroendócrinas del cerebro, mientras que TRH-R2 predomina en regiones importantes para la transmisión de señales somatosensoriales y en otras asociadas a las funciones superiores del SNC. Estas diferencias guardan relación con la función dual neuromoduladora/neurohormonal que se ha sugerido para el péptido (11).

La transducción intracelular de TRH-Rs está acoplada a proteínas  $G_{q/11}$ , lo que resulta en la activación de la fosfolipasa C (PLC), que estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2) para formar inositol 1, 4, 5-trifosfato (PIP3) y 1, 2-diacilglicerol (DAG); estos segundos mensajeros promueven un aumento en la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  y la activación de la proteína cinasa dependiente de  $Ca^{2+}$  (PKC) (12, 13).

La activación de los TRH-Rs también estimula a la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK) (14) y a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) (15, 16). Los TRH-Rs también se acoplan a proteínas  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$  y a una proteína del tipo  $G_s$  que no activa a la adenilciclase (AC) (17).

## 1. 2 Función neuroendócrina de TRH.

Esta función de TRH se debe a que las proyecciones de la subdivisión medial (NPV<sub>m</sub>) y periventricular del NPV, donde se ubican las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas, llegan a la eminencia media (EM), estructura que funge como reservorio temporal del péptido y como vínculo entre el hipotálamo y la adenohipófisis (10, 18).

El péptido vertido a la circulación portahipofisaria desde la EM, se une a TRH-R1 en los tirotrópos de la adenohipófisis; éstos liberan la hormona estimulante de la tiroides (TSH) o tirotropina, que finalmente promueve la síntesis y liberación de hormonas tiroideas (HT) triyodotironina ( $T_3$ ; más activa) y tiroxina ( $T_4$ ; menos activa) hacia la circulación general (9).

En sus órganos blanco: tejido muscular, óseo, hígado, riñones, entre otros, la unión de  $T_3$  a los receptores nucleares a HT (TR) induce la transcripción de diversos genes involucrados en la lipólisis y la glucólisis, mecanismo por el cual promueve el gasto energético; alrededor del 30% del gasto energético total diario de un individuo se debe a la actividad de las HT (19, 20).

La regulación del eje HHT se da por un mecanismo clásico de retroalimentación negativa, donde un aumento en la concentración circulante de HT, particularmente  $T_3$ , inhibe la expresión de TSH en la adenohipófisis y de TRH en las neuronas hipofisiotrópicas del NPV (21, 22).

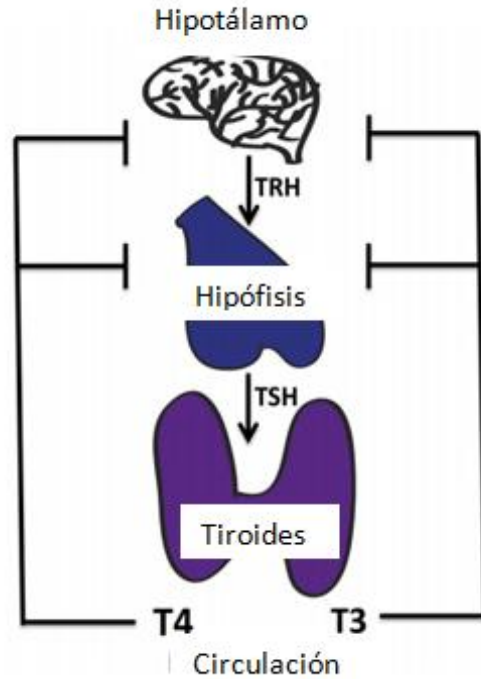


Figura 2. El eje HHT se regula por retroalimentación negativa. Adaptado de (23).

$T_3$  es la forma activa de HT por tener mayor afinidad que  $T_4$  por TR; a nivel del NPV, el papel de  $T_3$  es aún más significativo puesto que participa en la regulación de la expresión local de TRH. En esta región, la disponibilidad de  $T_3$  depende de la actividad de la desyodasa 2 (D2), una selenoenzima que cataliza la desyodinación de  $T_4$  en la posición 5' de su anillo externo (24, 25).

Si bien la actividad de D2 es prácticamente nula en el NPV (26), este núcleo es provisto con  $T_3$  gracias a la actividad de D2 de los tanicitos, células que bordean el tercer ventrículo y cuyas terminales axónicas inervan al NPV. Por lo tanto, la actividad de D2 modula la concentración de  $T_3$  en el NPV y en consecuencia, la expresión local de TRH (25, 27).

### 1. 3 Funciones no hipofisiotrópicas de TRH.

Como se ha descrito, TRH juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis energética, lo anterior no sólo se debe a sus efectos sobre el eje HHT sino también a efectos centrales sobre la conducta alimentaria, la termogénesis, la locomoción y las funciones autónomas, derivados del carácter neuromodulador del péptido (8).

### 1. 3. 1 TRH como anorexigénico.

A diferencia de las neuronas TRHérgicas con función hipofisiotrópica, existe un grupo de neuronas TRHérgicas ubicadas en el NPV anterior (NPVa) cuyas proyecciones no se dirigen a la EM y por lo tanto, no están involucradas en la función neuroendócrina del péptido ni están sujetas a la regulación por HT (28, 29).

Sin embargo, igual que las neuronas del NPVm y periventricular, el NPVa también recibe aferentes de los péptidos orexigénicos (NPY/AgRP) y anorexigénicos ( $\alpha$ -MSH/CART) del ARC y del hipotálamo dorsomedial. Es probable que esta innervación sea responsable del efecto anorexigénico de TRH cuando se administra por vía central (intra tecal, i.c.v) o periférica (i.v, oral) (2, 30-37).

Adicionalmente, en estudios previos de nuestro laboratorio con ratas sometidas a un modelo de anorexia en el que, a pesar de la depleción de sus reservas energéticas, los animales parecen no tener motivación por el consumo de alimento (38), hemos encontrado un incremento en la expresión de TRH en el NPVa (27), lo cual se opone a la disminución encontrada en ratas que sí tienen motivación por el consumo de alimento, es decir, ratas sometidas a ayuno o restricción forzada de alimento, condiciones que llevan un balance negativo de energía (39); lo anterior sugiere que TRH podría estar participando en la desmotivación por el consumo de alimento en este paradigma de anorexia.

También es posible que este efecto sea mediado por la acción del péptido sobre sus propios receptores en algunas regiones cerebrales involucradas en procesos motivacionales asociados a la conducta alimentaria, como el N. Acc, donde se expresa el receptor TRH-R1, así como en otras áreas relacionadas con el componente emocional o afectivo de una conducta, por ejemplo la amígdala, donde se expresan ambos receptores de TRH (TRH-R1 y TRH-R2) (40).

Por otro lado, sus efectos sobre la termogénesis probablemente se deban a la asociación del NPVa con el área preóptica involucrada en la activación del sistema nervioso simpático (41).



### 1. 3. 2 TRH y otros neurotransmisores.

Otras funciones extrahipotalámicas de TRH parecen ser mediadas por la abundancia de TRH-R2 en el SNC (11) y por la asociación de varios neurotransmisores con el péptido, al aumentar o inhibir su liberación en modelos *in vitro* e *in vivo*.

En estudios *in vitro* sobre células hipotalámicas de rata, la dopamina (DA) y la norepinefrina promueven la liberación de TRH mientras que serotonina (5-HT) la inhibe; estos mismos hallazgos han sido reproducidos *in vivo* (42, 43).

A la fecha no se ha llegado a un consenso sobre los efectos de TRH en la neurotransmisión inhibitoria (mediada por GABA: ácido gamma amino butírico) y la excitatoria (mediada por glutamato, NMDA [N-metil-D-aspartato]) y tampoco a los efectos de éstas sobre la liberación de TRH, ya que existen resultados opuestos según el tejido analizado y la concentración utilizada de TRH o de moléculas análogas a los neurotransmisores (44, 45).

Por ejemplo, la exposición de tejido de hipocampo a TRH *in vitro*, tiene efectos excitatorios al parecer mediados por la potenciación de la respuesta despolarizante evocada por NMDA, AMPA (ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) y glutamato (46, 47).

Además, se ha reportado que la administración i.v de TRH tiene efectos analépticos posiblemente atribuibles a un efecto excitatorio, puesto que revierte el efecto sedativo y la hipotermia causada por pentobarbital (i.p) incluso cuando se administra una dosis letal de éste (48), asimismo, la administración directa de TRH en la corteza, el hipotálamo, el tálamo y el cerebelo, reduce el tiempo de sedación inducido por barbituratos, en conejos (49). Estos efectos se han atribuido principalmente a la acción de TRH sobre el circuito colinérgico septohipocampal (50).

Sin embargo, también se ha sugerido que TRH podría jugar un papel inhibitorio en modelos de epilepsia donde la actividad excitatoria aumenta, por ejemplo en el modelo de kindling amigdalino y la terapia de electroshock (51).

La inducción del sistema neuronal TRHérgico en regiones límbicas como la amígdala y el hipocampo derivada de estos tratamientos, se propuso como un mecanismo

compensatorio de la actividad excitatoria sugiriendo una función homeostática o anticonvulsivante del péptido (52-56).

Cabe señalar que estos efectos conductuales de la administración de TRH son independientes de la función neuroendócrina del péptido dado que persisten a pesar de la remoción de la glándula tiroides o de la hipófisis (57).

En suma, las evidencias en torno a uno y otro papel de TRH podrían indicar que sus efectos son estado-dependientes, es decir que la expresión y el contenido del péptido se modifican como una respuesta compensatoria ante determinados estímulos.

### 1. 3. 3 TRH como modulador del estado de ánimo.

La ambigüedad en la actividad inhibitoria/excitatoria de TRH y la posibilidad de un carácter estado-dependiente lo han propuesto como un posible blanco farmacológico en el tratamiento del trastorno bipolar (58).

Además, se ha sugerido que TRH podría tener un efecto antidepresivo ya que su administración i.v o intratecal induce la remisión de depresión mayor en humanos (59) y disminuye la inmovilidad en la prueba de nado forzado en ratas (36); además, los choques electroconvulsivos (tratamiento antidepresivo) en ratas favorece, entre otros cambios, el aumento de TRH en múltiples regiones subcorticales y corticales frontales, como el hipocampo, la amígdala, la corteza entorrhinal y la corteza piriforme, que en humanos participan en procesos depresivos (60).

En animales, se ha propuesto que la administración de TRH (oral o i.v o intratecal) **potencia el efecto de fármacos** antidepresivos y **ansiolíticos**, que a su vez aumentan el contenido de TRH y de péptidos similares a TRH (TRH-like peptides) como TRH-Gly y Ps4 en las mismas regiones cerebrales (61-64).

Asimismo, ratas inyectadas i.c.v con TRH, presentan conductas ansiosas en menor grado que los animales no inyectados cuando son sometidas a pruebas de ansiedad como la de sobresalto acústico o la prueba de enterramiento defensivo (ED) (65-67), sugiriendo un **papel ansiolítico del péptido**.

Además, la conducta de ED recientemente se ha visto asociada con el N. Acc como uno de sus sustratos así como del componente motivacional de la conducta alimentaria; el N. Acc también es un punto de convergencia de la vía TRHérgica con la vía dopaminérgica, mismas que podrían participar en la modulación de la conducta alimentaria y la ansiedad (67, 68).

#### 1. 4 Regulación de la expresión TRH.

Igual que otros factores hipotalámicos, TRH es sintetizado como un precursor (pre-pro TRH) de elevado peso molecular que contiene 5 copias de la secuencia Gln-His-Pro-Gly flanqueada por sitios de procesamiento (69).

A nivel transcripcional, la secuencia entre -547 y +84 del promotor de TRH en la rata (rTRH), el ratón y el humano, confiere total actividad transcripcional basal y dentro de esta secuencia existen elementos de respuesta a los factores de transcripción: proteína activadora 1 (AP-1), proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (adenosín monofosfato cíclico) (CREB; CRE) y también elementos de respuesta a receptores a glucocorticoides (GC; GREs) (69, 70).

En rTRH existen también dos elementos similares al sitio consenso CRE: CRE-2 y CRE-1 o Sitio 4, este último se une a CREB fosforilado (pCREB) y se traslapa con un elemento de respuesta al receptor de HT (TRE), mediante el cual las HT inhiben la transcripción de TRH (32, 71).

El mecanismo de acción de los GC es menos claro puesto que se han observado efectos opuestos sobre la transcripción de TRH, *in vivo* e *in vitro*. En el primer caso, los GC inhiben la transcripción de TRH probablemente porque impiden la fosforilación de CREB en el NPV; en el segundo, tanto el tiempo de exposición a los GC como la existencia de varios “medios-sitios” de la región GRE, estarían involucrados en los efectos transcripcionales ambiguos (72).

CREB, un regulador clave en la expresión génica, depende de la fosforilación de su residuo Ser133 para ser activo; una serie de proteínas cinasas son capaces de llevar a cabo dicha fosforilación, convirtiéndolo en un punto de convergencia muy significativo en las cascadas de señalización intracelular (73).

Aunque otros residuos de CREB pueden ser fosforilados, el más estudiado es el que se da en Ser133; la fosforilación de este residuo puede ser resultado de estimulación eléctrica o de la unión de neurotransmisores y hormonas a GPCRs (74).

CREB puede ser fosforilado también en diversas cascadas de transducción y señalización intracelular, como la de Ras/Raf/MEK/ERK o bien la de Ras/PI3K/PTEN/Akt, que consisten en cinasas reguladas por fosforilación y desfosforilación, y que son mediadas por cinasas, fosfatasas y proteínas intercambiadoras de GTP/GDP (guanosina trifosfato/guanosina difosfato) específicas. Otras cinasas que pueden fosforilar a CREB son las CaMKs, predominantemente CaMKIV por su ubicación nuclear (73, 75).

Finalmente, CREB puede ser fosforilado por PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc) mediante el siguiente mecanismo: la activación de la subunidad Gs de un GPCR promueve la actividad de la AC; el aumento en la concentración de AMPc promueve la disociación de las subunidades regulatorias de las subunidades catalíticas de PKA liberándolas para fosforilar a proteínas blanco, como CREB (76-78). A continuación se esquematizan las cascadas de señalización involucradas en la fosforilación de CREB.

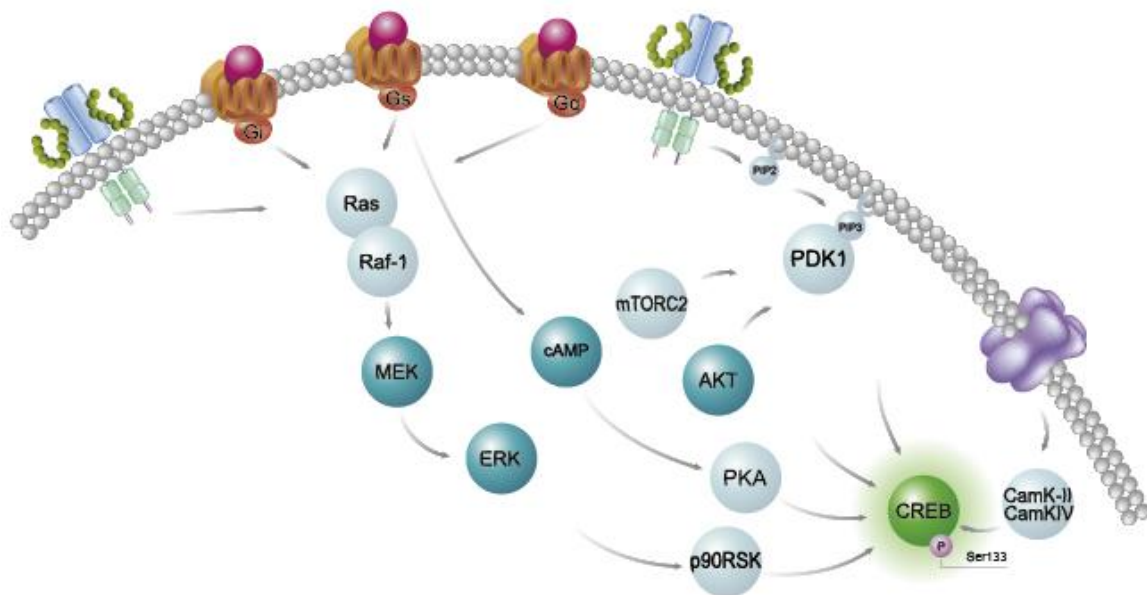


Figura 3. Diferentes cascadas de señalización intracelular pueden fosforilar a CREB. Tomado de (79). La unión de ligandos a sus GPCRs promueve la actividad de cierta subunidad de la proteína G: Gs promueve la actividad de AC y la síntesis de AMPc; Gi inhibe la síntesis de AMPc; Gq activa a PLC que hidroliza a PIP2 para formar PIP3. La

estimulación de estas subunidades de la proteína G, lleva a la activación de la vía Ras/Raf1/MEK/ERK: MEK1 (cinasa de la proteína cinasa 1 activada por mitógeno), ERK1/2 (cinasa regulada por señalización extracelular), p90<sup>Rsk1</sup> (cinasa 1 S6 p90 ribosomal); o bien a la activación de la vía Ras/PI3K/PTEN/Akt: PTEN (homólogo de fosfatasa y tensina deletado en el cromosoma 10), proteína cinasa B (Akt), cinasa dependiente de fosfatidilinosítido (PDK), blanco mamífero de rapamicina (mTOR). El aumento en la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> y la unión de éste a CaM, promueven la actividad de CaMKII y CaMKIV, que también pueden fosforilar a CREB (80).

La sensibilidad de las vías de transducción sugiere la importancia del mantenimiento de una concentración relativamente constante de sus componentes; en el caso del AMPc, su concentración varía poco alrededor de 0.1 µM, permitiendo que la cascada responda en repetidas ocasiones a un estímulo; tal equilibrio es logrado por la intervención de las enzimas que promueven la síntesis del AMPc, las AC, y de aquellas que lo degradan o fosfodiesterasas (PDEs) (81, 82).

#### 1.4. 1 Relevancia de las PDEs en las cascadas de señalización intracelular.

Las PDEs han cobrado importancia farmacológica debido a las particularidades de cada isoforma: distribución tisular específica y afinidad por su sustrato (AMPc o GMPc [guanosín monofosfato cíclico]). Son la diversidad y al mismo tiempo las características específicas de cada PDE lo que ha promovido el diseño de novedosos inhibidores con miras en el tratamiento de patologías que se sabe cursan con alteraciones en estas vías de señalización (83).

Hoy en día, algunos inhibidores de PDE ya se usan en la farmacoterapia de padecimientos como la disfunción eréctil (Sildenafil o Viagra es un inhibidor de PDE5) (86) y algunos otros se prueban, por ejemplo, para el tratamiento de procesos inflamatorios y depresión (Rolipram es un inhibidor de PDE4) (85).

Sin embargo, las investigaciones y ensayos clínicos con PDEs están en buena parte limitados por la disponibilidad comercial de inhibidores específicos para las variantes de cada enzima; uno de estos pocos inhibidores es el BRL-50481 (86), un inhibidor selectivo de la PDE7, cuya isoforma PDE7B, se expresa de manera preferencial en el hipotálamo y

en el N. Acc (87); los alcances de este inhibidor han sido poco explorados tanto *in vivo* como *in vitro* (88-90).

Lo anterior sugiere que existe un amplio panorama en el que los inhibidores de PDE pueden ser probados para estudiar sus efectos sobre las cascadas de señalización en tejidos y regiones del cerebro de manera relativamente específica.

#### 1. 4. 2 Efecto del estado nutricional en la expresión de TRH.

La invasión y cercanía de las neuronas sintetizadoras de péptidos orexigénicos y anorexigénicos en el hipotálamo, principalmente en el NPV y el ARC, respecto a las neuronas TRHérgicas, facilita su regulación mutua y en consecuencia el consumo de alimento (1-3).

Durante el ayuno, existen bajos niveles circulantes de leptina (una hormona anorexigénica), que al unirse a sus receptores en el ARC favorece el aumento en la expresión de NPY y AgRP. El mecanismo de acción de NPY es promover el aumento en la actividad de D2 y con ello la concentración de HT, que tienen un efecto inhibitorio sobre la expresión de TRH (hipofisiotrópico).

Por otro lado, AgRP antagoniza a los receptores (MC4-R) del péptido anorexigénico  $\alpha$ -MSH; la unión de  $\alpha$ -MSH a sus receptores, GPCRs, promueve la síntesis de AMPc y la cascada de señalización consecuente que lleva a la fosforilación de CREB y a un aumento en la expresión de TRH (en el NPVa; no hipofisiotrópico) (30-33, 91, 92).

La disminución en la expresión de TRH que se presenta durante el ayuno o la restricción alimentaria forzada, constituye un mecanismo adaptativo que facilita la economía de las reservas energéticas, aunado a la atenuación de la actividad del eje HHT: la disminuida concentración sérica de HT y de TSH, provoca una condición a la que se le conoce como hipotiroidismo terciario (93, 94). Sin embargo, existen otros casos en los que el eje HHT parece no adaptarse al balance negativo de energía, por ejemplo, durante la anorexia nerviosa (AN) (95, 96).

## 2. TRH en un modelo de AN.

De acuerdo con el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM-IV), la AN se caracteriza por la evitación del consumo de alimento aún en presencia de éste y a pesar de una disminución grave del peso corporal (97). Los pacientes con AN sufren alteraciones en la función del eje HHT presentando hipotiroidismo central (a nivel hipotalámico), que cursa con concentraciones séricas disminuidas de  $T_3$  y normales o disminuidas de TSH (98). Aunado a estos cambios, presentan concentraciones séricas de leptina e insulina disminuidas, además de disminución de la temperatura corporal y del gasto energético basal (99).

La importancia del estudio de la AN radica en su creciente incidencia durante las últimas décadas, principalmente en mujeres jóvenes (entre 0.3 y 0.7% de la población general) (100, 101), y en la comorbilidad que existe entre la AN y los trastornos del estado de ánimo, ya que alrededor del 45% de las pacientes con AN padecen o han padecido depresión severa, mientras que **más del 60% ha sido diagnosticada con algún trastorno de ansiedad**, entre los que destacan el trastorno obsesivo-compulsivo y las fobias (102, 103).

Los pacientes con AN y aquellos con trastornos de ansiedad, comparten hiperactividad del eje adrenal manifiesta como aumento en la concentración sérica de cortisol y de hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el líquido cefalorraquídeo (104); además presentan hiperactivación del sistema cortico-límbico, principalmente asociado con una desregulación de las vías de neurotransmisión como las de 5-HT y DA en regiones como el estriado y la amígdala, cuya disfunción se ha asociado con los síntomas afectivos y emocionales observados en ambas patologías (105).

La terapia farmacológica utilizada en los pacientes con AN tiene como objetivo la normalización de la conducta alimentaria y el peso corporal pero también la disminución o erradicación de la ansiedad y depresión adyacentes, sin embargo, la mayoría de los fármacos ansiolíticos y antidepresivos disponibles hoy en día, intervienen con la señalización de más de un neurotransmisor y por lo tanto **resulta difícil definir específicamente a cuál de ellos se debe la mejora en el consumo de alimento** y las mejoras en el estado general de los individuos (106).

Adicionalmente, sistemas neuronales que incluyen a CRH, CART, NPY y leptina están involucrados tanto en la modulación de la conducta alimentaria como en el estado de ánimo, por lo que constituyen posibles blancos farmacológicos para tratar la AN (107).

## 2. 1 Modelo animal de anorexia inducida por deshidratación (AID).

Con la finalidad de reproducir y explicar la regulación diferencial del eje HHT y otros cambios bioquímicos que se presentan durante la AN, se ha caracterizado el modelo animal de AID.

Este modelo, que dura 5 días, consta de 3 grupos de ratas sujetos a diferentes condiciones de bebida y alimento:

1. Grupo control: recibe agua corriente y alimento, ambos *ad libitum*.
2. Grupo AID: recibe una solución de NaCl al 2.5% como bebida y alimento, ambos *ad libitum*.
3. Grupo de restricción alimentaria: recibe agua corriente *ad libitum* y la misma cantidad de alimento consumida por el grupo de AID.

El grupo de AID presenta una disminución del 90% en el peso corporal respecto al grupo control y reducción en el consumo de alimento respecto al mismo grupo desde el día uno del modelo, alcanzando una disminución del 26% en el último día del experimento (38).

Los animales AID, a diferencia de aquéllos con restricción alimentaria quienes sí tienen motivación para comer, es decir, comerían si tuvieran más alimento disponible, paradójicamente presentan **síntesis aumentada de TRH en el NPV** y mayor concentración sérica de TSH junto con un menor contenido de HT, lo que evidencia que el eje HHT no disminuye su funcionamiento a pesar de que estos animales se encuentran en balance negativo de energía (38, 39).

En cambio, se ha encontrado que el aumento en la expresión de TRH en el NPV del grupo AID se presenta específicamente en el NPVa (27) que carece de función hipofisiotrófica pero que, como se ha mencionado, tiene conexiones hacia núcleos involucrados en la regulación de la conducta alimentaria como el ARC, el HL y el hipotálamo dorsomedial (41).



Fuera del hipotálamo, el NPVa proyecta hacia el área tegmental ventral (ATV) y el N. Acc y además, está inervado por axones provenientes de las neuronas productoras de péptidos anorexigénicos (41), por lo tanto, estos elementos podrían estar confiriéndole a TRH un efecto anorexigénico en el modelo de AID.

Dado que en este modelo se observa 1) conducta de anorexia y 2) una desregulación del eje HHT, podríamos resumir que la AID induce la activación de dos poblaciones de neuronas TRHérgicas en distintas subdivisiones del NPV que son funcionalmente diferentes, una población, el NPV caudal (NPVc), es probablemente la responsable de la elevación en la concentración plasmática de TSH, y la otra (el NPVa) al parecer puede participar en la conducta de anorexia de las ratas en este modelo (27).

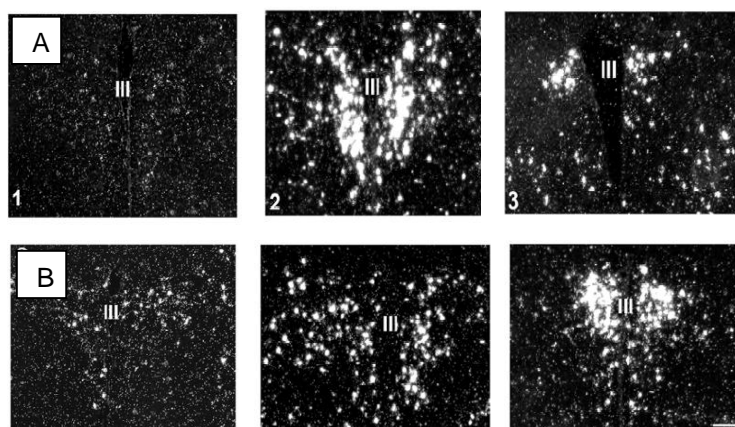


Figura 4. Micrografías en campo oscuro de muestras representativas del mRNA de pro-TRH en NPV. Las imágenes son magnificaciones de las subdivisiones del NPVa (1), NPVm (2) y NPVc (3) de animales control (A) y AID (B), Tercer ventrículo (III). Escala, 200  $\mu$ m. Adaptado de (27).

## 2. 2 TRH en el sistema límbico durante el modelo de AID.

Los cambios en el contenido de TRH en regiones del sistema límbico de ratas sometidas al modelo de AID, como la corteza insular (aumento) y el N. Acc (disminución) (108), sugieren también un papel extra-hipotalámico del péptido, tal vez regulando otros componentes de la conducta alimentaria como la motivación por el consumo de alimento.

El N. Acc se considera uno de los principales sustratos de los efectos de recompensa provocados por diversas drogas de abuso y otros estímulos como el consumo de alimento, debido a que puede interactuar con el sistema dopaminérgico mesolímbico y las proyecciones de éste (109). En el N. Acc podemos ubicar dos regiones bien delimitadas, la corteza (shell) y el núcleo (core), cuya distinción más importante, pero no la única, son sus conexiones aferentes y eferentes (110).

El núcleo del accumbens se ha asociado a los cambios en la actividad motriz debido a su relación con el sistema límbico, mientras que su corteza, que se comunica con la amígdala extendida (el núcleo cama de la estría terminal, (bed nucleus of stria terminalis), y núcleo central de la amígdala) y el HL, es más susceptible a activarse por estímulos estresantes; lo anterior apunta a que esta región en su conjunto, puede activarse frente a estímulos apetitivos pero también adversos (111).

**Los animales sometidos al modelo de AID presentan un incremento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc y disminución en el contenido del péptido;** además la expresión del receptor TRH-R1 está incrementada, sugiriendo que la vía del péptido se encuentra activa en este núcleo y que podría estar involucrada en la evitación del consumo de alimento en estos animales (108, 112).

Asimismo, en esta región la vía TRHérgica interactúa con la vía dopaminérgica, asociada con mecanismos de recompensa por la alimentación y la respuesta a cambios en la concentración de glucosa inducidos por estrés (113). Un ejemplo que evidencia la interacción de ambas vías es la inyección bilateral directa de TRH en el N. Acc, que aumenta la actividad locomotora y produce cambios conductuales similares a los producidos por DA; la anulación de dicho efecto cuando las terminales dopaminérgicas de este núcleo son destruidas, sugiere que los efectos locomotores inducidos por TRH son mediados por DA. Por otro lado, la inyección periférica de TRH en ratas produce efectos conductuales similares a los producidos por la inyección directa en el N. Acc pero menos duraderos (114-117).

Cabe señalar que el N. Acc está involucrado también en el consumo de alimentos mediante mecanismos hedónicos como el “gusto o liking” y el “deseo o wanting”. Las alteraciones en este sistema de recompensa del cerebro podrían llevar a ambos extremos de la conducta alimentaria, por una parte, al consumo excesivo de alimentos y el

sobrepeso y obesidad consecuentes o bien, a la supresión de dichos mecanismos, lo que conduciría a la anorexia (118, 119).

Existen pocas evidencias sobre la actividad del N. Acc en pacientes con AN, sin embargo, un estudio reciente demuestra que la inactivación de este núcleo mediante cirugía estereotáxica es eficaz en el manejo de AN resistente al tratamiento, con franca mejoría en la ingesta de alimento y también en la sintomatología ansiosa con que cursan los pacientes (120).

### 3. N. Acc y ansiedad.

En roedores, los estímulos estresantes activan las neuronas dopaminérgicas del ATV que expresan receptores a GC y que envían sus proyecciones hacia el N. Acc. En condiciones normales esta comunicación se ha considerado favorecedora de un mejor acoplamiento ante experiencias adversas (121-123).

Algunos estímulos que generan aumento en la señalización dopaminérgica en el N. Acc como el estrés crónico y las drogas de abuso, inducen **un aumento en la activación de CREB** (fosforilación y transcripción mediada por unión a CRE) mediante la cascada de señalización del AMPc, una neuroadaptación que disminuye la repuesta ansiosa (ante el estresor) y el efecto compensatorio (de las drogas de abuso), como se ha observado en modelos de roedores (124-126).

Su participación en la modulación de la ansiedad cada vez cobra más fuerza: **la estimulación cerebral profunda dirigida a este núcleo** en pacientes con desórdenes severos de ansiedad y obsesivos-compulsivos, causa **una disminución importante en la intensidad de los síntomas** (120, 127, 128). Es posible que estos resultados se relacionen con la interacción del N. Acc con circuitos cerebrales específicos que participan de manera directa en el procesamiento de estímulos estresantes y ansiogénicos, como la corteza prefrontal, el hipocampo y la amígdala (129, 130).

#### IV. JUSTIFICACIÓN.

La conducta alimentaria es una conducta compleja afectada por factores como el estado nutricional y emocional del individuo; la integración de dichos factores se lleva a cabo de manera central en el hipotálamo y en otras regiones clave del sistema límbico como el N. Acc (1-3).

Un claro ejemplo de la asociación entre el componente nutricional y anímico son los trastornos de la conducta alimentaria, como la AN, un trastorno psiquiátrico de etiología multifactorial que es más frecuente en mujeres jóvenes (92, 93); se estima que su incidencia es de alrededor de 109 casos por cada 100 000 individuos y que el rango de edad más afectado es el de 15 a 19 años (131-133).

Una de las comorbilidades más significativas de la AN son los trastornos de ansiedad, principalmente el trastorno obsesivo compulsivo y las fobias, que aquejan a más del 50% de los pacientes (102, 103).

Aún no es claro si la AN es consecuencia de la ansiedad o si ésta deriva de la AN, y tampoco son claros los procesos neurológicos que asocian a ambas patologías, sin embargo, la implicación del sistema de recompensa, del cual es parte el N. Acc, se ha convertido en un vínculo probable entre estados emocionales como la ansiedad y el carácter hedónico y la motivación por del consumo de alimento, debido a sus proyecciones hacia el sistema límbico y también hacia otros centros neurales de la homeostasis energética como el NPV (118, 119).

TRH, un péptido sintetizado en el NPV y en regiones extra hipotalámicas como el N. Acc (7), se ha implicado en las conductas de anorexia y ansiedad (2, 30-37, 61-67); la expresión de este péptido es promovida por pCREB (69, 70), un factor de transcripción que puede ser activado por la cascada del AMPc (76-78), lo cual sugiere que la estimulación de la vía TRHérgica en el NPV y en el N. Acc por la inhibición de la PDE7 que se expresa particularmente en esas regiones, podría llevar a animales control a desplegar las conductas de anorexia y ansiedad.

Este acercamiento también ayudaría a examinar la participación de la vía TRHérgica del NPV y del N. Acc en estas conductas, durante el modelo de AID. Además se explorarían

los efectos anorexigénicos y ansiolíticos potenciales de un fármaco cuyo blanco de acción, la PDE7, tiene una distribución cerebral específica.

En suma, nuestros resultados podrían ayudar a esclarecer si las conductas de ansiedad y anorexia son afectadas por la expresión de TRH en el NPV y en el N. Acc y también podrían aportar información para el desarrollo de una terapia farmacológica que aborde estas enfermedades.

## **V. HIPÓTESIS.**

La expresión de TRH no hipofisiotrópico en el NPV y en el N. Acc es promovida por la cascada del AMPc, por lo cual suponemos que la expresión de TRH en esas regiones aumentará tras la inhibición de la PDE7. Dados los efectos anorexigénicos y ansiolíticos de TRH, suponemos que una mayor expresión de éste en el NPV provocará anorexia, y en el N. Acc ansiólisis, en animales control. Por otro lado, suponemos que durante el modelo de AID, una mayor expresión de TRH en el NPV y en el N. Acc, estará asociada con la conducta de anorexia, y en particular en el N. Acc, con ansiólisis.

## **VI. OBJETIVO PRINCIPAL.**

Evaluar los efectos de la administración de un inhibidor de PDE7 sobre la expresión de TRH en el NPV y el N. Acc así como la asociación de éstos con la conducta alimentaria y ansiedad.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES.**

- ⤴ Construir una curva dosis-respuesta y un curso temporal de un inhibidor de PDE7, administrado en animales control por vía i.p, considerando su efecto sobre la conducta de ansiedad.
- ⤴ Conocer los efectos de la inhibición de la PDE7 sobre la expresión de TRH del NPV y del N. Acc en animales control y en animales con AID.
- ⤴ Comparar el efecto de la inhibición de PDE7 sobre la conducta alimentaria y ansiedad en animales control y con AID.

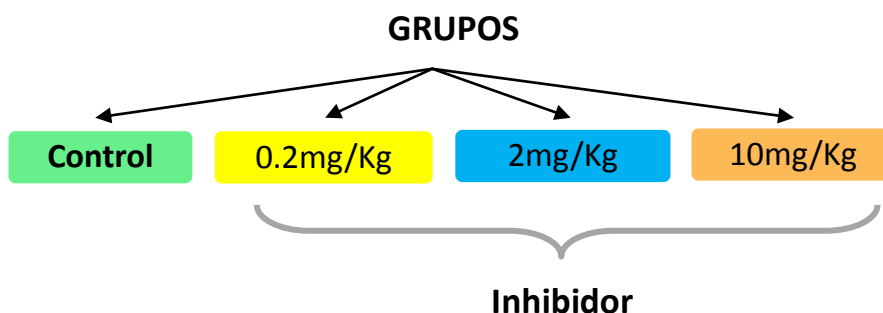
- ▲ Asociar los cambios en la expresión de TRH del NPV y N. Acc con las conductas de anorexia y ansiedad, respectivamente, en animales con inhibición de la PDE7.
- ▲ Evaluar la expresión de D2 en el hipotálamo de animales control y AID y compararla con la expresión de TRH.
- ▲ Evaluar el efecto de la administración directa en el N. Acc, de TRH y de un inhibidor de PDE7, sobre la conducta de ansiedad en animales alimentados *ad libitum*.

## VIII. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1. Determinación de la dosis efectiva de inhibidor de PDE7 con efecto ansiolítico administrado vía i.p en animales control.

32 ratas Wistar macho adultas de entre 250 y 300 g de peso, en un ciclo de luz oscuridad (7-19 hrs), fueron divididas en 4 grupos de 8 animales cada uno (n=8). Todos los grupos fueron habituados durante 3 días consecutivos, en el mismo horario, a la prueba de ED. La habituación consistió en colocar a cada rata en la caja de la prueba sin la fuente de choques o electrodo, durante 10 minutos.

En el día 4, cada animal fue inyectado **vía i.p** con 1 ml/Kg de vehículo (DMSO al 2 %: 2 ml de dimetilsulfóxido en 100 ml de solución salina al 0.9%) o una de las 3 diferentes dosis de inhibidor (0.2, 2, 10 mg/Kg peso). El rango de dosis seleccionadas se elaboró tomando como referencia la dosis usada por Nandhakumar y cols. (89, 90) debido a que es una de las pocas referencias del uso *in vivo* de este fármaco.



El inhibidor se administró durante la fase de luz en un horario de 8 am a 11 am. Media hora después de la inyección, los animales fueron sometidos a la prueba ED (se describe adelante), que fue registrada en video para su posterior análisis. Media hora después de

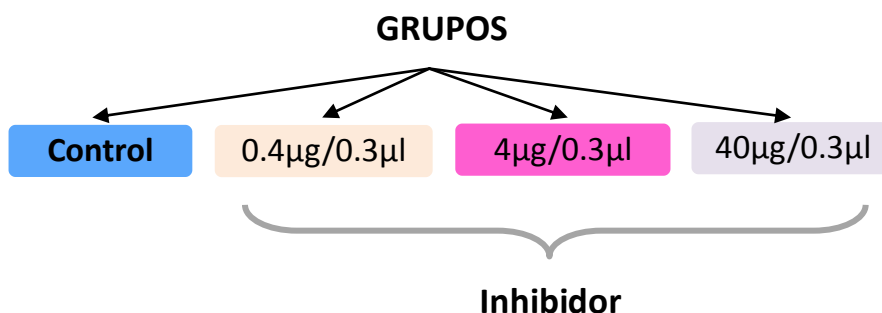
terminada la prueba, se sacrificaron los animales por decapitación y se obtuvieron los cerebros, que se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

La dosis efectiva de inhibidor se definió como aquella que produjera un efecto ansiolítico respecto a los animales administrados con vehículo.

## 2. Determinación de la dosis efectiva de inhibidor de PDE7 con efecto ansiolítico administrado intra N. Acc.

Una vez determinadas la dosis y la duración del efecto del inhibidor inyectado vía i.p, se procedió a inyectar el fármaco directamente en el N. Acc mediante cirugía estereotáxica. Se utilizaron 16 ratas Wistar macho entre 250 y 300 g y las coordenadas del Atlas de Paxinos y Watson (136) AP 1.7, L  $\pm$  1, DV -6.8 respecto a Bregma, que corresponden a la corteza del N. Acc.

Los animales fueron anestesiados con una combinación de ketamina (100 mg/Kg) y xilacina (13 mg/Kg) para inducir un periodo de anestesia de 45 a 60 minutos. Los animales fueron colocados en el aparato estereotáxico y ajustados a éste mediante sujetadores óticos. Se seccionó con un bisturí, de manera transversal, la piel de la cabeza y la duramadre para descubrir el cráneo; una vez expuestas las fisuras craneanas, se localizó el N. Acc a partir de las coordenadas “blanco” o de referencia a partir de bregma siguiendo el Atlas de Paxinos y Watson (136). Ubicado dicho punto, se utilizó un taladro para hacer un trépano pequeño que permitiera insertar una jeringa Hamilton (5 $\mu$ l) en la coordenada dorso-ventral correspondiente y se inyectó el fármaco; esta actividad se realizó bilateralmente.



Las dosis utilizadas para este experimento fueron 0.4, 4 y 40 µg/0.3 µl (n=4/grupo), con base en la determinación de las características del inhibidor de PDE7 (BRL-50481) obtenidas por Smith y cols. (86) tras la identificación de este compuesto. Estas concentraciones en µg corresponden a soluciones 0.0054 mM, 0.054 mM y 0.54 mM, respectivamente.

En la planeación de este experimento se consideró lo siguiente: dado que por vía i.p el efecto ansiolítico del inhibidor prevalece hasta 24 horas, los animales fueron operados un día antes de someterlos a la prueba de ED. En promedio es posible operar hasta 8 animales durante el periodo de luz, por lo que las cirugías debieron realizarse a lo largo de 3 días: cada día una de las 3 dosis diferentes y su grupo control.

24 horas después de la inyección, todos los animales fueron sometidos a la prueba de ED y ésta fue registrada en cada caso para su posterior análisis. Media hora después de terminada la prueba, se aplicó la eutanasia por decapitación, se obtuvieron los cerebros y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

### **3. Efecto conductual de la inyección de TRH intra N. Acc.**

Tras la observación del efecto ansiolítico del inhibidor administrado intra N. Acc, nos propusimos corroborar si este efecto era similar a la inyección de TRH directamente en el N. Acc, apoyando el papel ansiolítico del péptido (137, 61-66) en esta región.

Para ello utilizamos 16 animales con las características ya mencionadas y los dividimos en grupo control y grupo TRH (n=4/grupo). Mediante cirugía estereotáxica, usando el método y las coordenadas ya mencionadas, los implantamos con una cánula directamente en el N. Acc derecho; esta adaptación de las maniobras previamente descritas se debió a que la biodisponibilidad de TRH es muy breve (alrededor de 5 min) (58) y era indispensable reducir el tiempo entre la administración y la prueba conductual.

La cánula guía fue elaborada con una aguja 28G (G se refiere a "gauge" o luz de la aguja) de 12 mm de largo colocada en las coordenadas del N. Acc ya mencionadas. La cánula permite inyectar al animal en cualquier momento (sin someterlo) mediante una jeringa Hamilton evitando que se estrese.



Luego de la cirugía, los animales se recuperaron durante 7 días; cada día se verificó que la luz de la cánula estuviera libre insertando un mandril sin inyectar ninguna sustancia ni estimular el núcleo.

En el día 3 de la recuperación los animales fueron inyectados manualmente con 3 µg/0.5 µl de TRH, entre 8 y 10 de la mañana, igual que sus respectivos controles inyectados con el mismo volumen de vehículo (solución salina al 0.9%). La jeringa se mantuvo dentro de la cánula durante 2 minutos para permitir que el péptido difundiera adecuadamente y no regresara por capilaridad.

Media hora después de la inyección, los animales fueron sometidos a la prueba de ED y sacrificados por decapitación media hora después de la misma. Se obtuvieron los cerebros y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

#### **4. Modelo de AID e inyección i.p del inhibidor.**

Una vez que tuvimos los datos sobre ansiedad provocados por el inhibidor, administramos las dosis de 0.2 mg/Kg y 2 mg/Kg a animales control y a los sometidos al modelo de AID para determinar los cambios conductuales (consumo de alimento y ansiedad) en respuesta al fármaco.

A la totalidad de animales (48 ratas Wistar macho adultas de entre 250 y 270 g de peso) se le dividió en grupo control (n=24) y grupo AID (n=24). Se les proporcionaron 50 g de alimento diariamente, lo cual es alrededor del doble del consumo diario promedio de una rata macho del mismo peso, por lo que se considera alimentación *ad libitum*. Al grupo control se le proporcionó agua corriente como bebida *ad libitum*, mientras que al grupo de anorexia (AID) se le colocaron bebederos con una solución de NaCl al 2.5%.

El modelo de AID inició en el día denominado 0 respecto al momento en que se les provee a los animales la solución de NaCl 2.5%, y duró en total 5 días. Cada día en el mismo horario (16-17 hrs), los animales y el alimento consumido fueron pesados.

A partir del día 2 del modelo, todos los animales, control (C) y AID comenzaron la habituación a la prueba de ED.

En el último día del modelo los animales sometidos al modelo de AID fueron separados en tres grupos, un grupo fue inyectado i.p con vehículo (DMSO al 2%), otro con **0.2 mg/Kg** de inhibidor y uno más con **2 mg/Kg** de inhibidor (n=8/grupo). El resto de los animales (controles alimentados *ad libitum*), fueron inyectados con vehículo (DMSO al 2%) o con **0.2 mg/Kg** de inhibidor o bien, con **2 mg/Kg** de inhibidor (n=8/grupo) media hora antes de que iniciara el ciclo de oscuridad.

Finalmente se cuantificó el alimento consumido durante una hora después de la inyección e inmediatamente los animales fueron sometidos a la prueba de ED. Media hora después de la prueba conductual, los animales fueron sacrificados por decapitación, se obtuvieron los cerebros y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

## **5. Análisis de la prueba de ED.**

La prueba de ED fue desarrollada y validada en ratas por Treit y Pinel en 1981 (134), es un modelo de miedo condicionado, basado en la observación de que los roedores expuestos a un electrodo que emite una descarga eléctrica de baja intensidad (0.25 mA), lo enterrarán con aserrín presuntamente como una respuesta innata para impedir el contacto con este estímulo adverso.

La cantidad de tiempo empleado realizando esta conducta disminuye con el uso de ansiolíticos como las benzodiazepinas, de modo que a menor tiempo de enterramiento, se considera un estado de menor ansiedad (67).

Los parámetros cuantificados en esta prueba se miden en segundos y son:

- ▲ Tiempo acumulativo de enterramiento: consiste en movimientos rápidos y continuos de las patas delanteras empujando el material de cama con la finalidad de ocultar el electrodo; es una manifestación *activa* de ansiedad: a mayor tiempo de enterramiento mayor ansiedad.
- ▲ Congelamiento o freezing: se considera una expresión *pasiva* de ansiedad, la rata se mantiene inmóvil en cuatro patas mirando el electrodo luego de haber recibido un choque.

Los videos de la prueba de ED, fueron analizados para cuantificar únicamente el tiempo durante el que los animales realizaron **la conducta de enterramiento o la de**

**congelamiento**, puesto que son las dos conductas que reflejan mejor el estado de ansiedad de los animales.

#### **6. Disección de las regiones cerebrales de interés: N. Acc y NPV.**

Los cerebros congelados (-20°C) fueron disecados utilizando hielo seco pulverizado, agua destilada, navaja, sacabocado de 1 mm (Roboz Surgical Instrument Co., EUA) y bisturí del número 3. Utilizando la navaja se cortaron las rebanadas transversales de alrededor de 1 mm de grosor; una tras otra, se observó la aparición y desaparición de estructuras cerebrales usando como referencia las imágenes del atlas de Paxinos y Watson (136) hasta llegar a la rebanada correspondiente al N. Acc y al NPV respectivamente.

La rebanada correspondiente al N. Acc se cortó en las coordenadas entre 2.28 mm y 0.96 mm respecto a bregma; se aisló la estructura en ambos hemisferios y cada N. Acc se guardó y etiquetó apropiadamente a -20°C.

Posteriormente se obtuvo la rebanada correspondiente al NPV, correspondiente a una rebanada entre -1.08 y -2.04 mm respecto a bregma, debido al tamaño reducido de esta región, se empleó un sacabocados de alrededor de 1 mm de diámetro y se obtuvo un solo NPV por cada animal. Cada NPV etiquetó apropiadamente y se guardó a -20°C.

#### **7. Extracción del RNA total por el método de tiocianato de guanidina.**

Se basa en la separación de las sales para aislar los ácidos nucleicos; se requieren varios pasos que comprenden lisis celular, inactivación de nucleasas y separación de los ácidos nucleicos del lisado.

A cada NPV o cada N. Acc se le agregó un volumen de solución D con  $\beta$  mercaptoetanol (tiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio pH 25 mM, sarcosil 0.5%,  $\beta$  mercapto etanol 0.1 M) y se homogenizó (sonicador vibra cell VC-130) a baja intensidad por no más de 10 segundos. Sobre hielo frapé, a este lisado se le agregó un volumen de fenol saturado en agua con tratada con dietilpirocarbamato (DEPC), se agitó (vórtex Daigger Genie 2) durante 8 seg; se agregó 1/10 del primer volumen de acetato de sodio 2 M pH 4, se agitó y finalmente se adicionaron 3/10 del primer volumen de cloroformo isoamílico y se agitó.

La mezcla debió adquirir una apariencia lechosa. Se dejó reposar en hielo frapé durante 15 minutos.

N. Acc: 250  $\mu$ l solución D con  $\beta$  mercaptoetanol + 250  $\mu$ l fenol saturado en agua con dietilpirocarbamato (DEPC) + 25  $\mu$ l acetato de sodio 2M pH4 + 75  $\mu$ l cloroformo isoamílico.

NPV: 100  $\mu$ l solución D con  $\beta$  mercapto etanol + 100  $\mu$ l fenol saturado en agua con DEPC + 10  $\mu$ l acetato de sodio 2M pH4 + 30  $\mu$ l cloroformo isoamílico.

Posteriormente las muestras se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5810 R) durante 20 min a 10000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se le adicionó un volumen de isopropanol (250  $\mu$ l para N. Acc y 100  $\mu$ l para NPV), se agitó y se dejó reposar durante 24 horas a -20°C.

Las muestras se centrifugaron a 13800 rpm durante 30 min a 4°C y se decantaron cuidadosamente para eliminar al máximo el isopropanol. Se adicionó un volumen (200  $\mu$ l para N. Acc y 150  $\mu$ l para NPV) de etanol al 75% para lavar las paredes del tubo y se agitó con vórtex para desprender y remover las sales del precipitado, se decantó. Este proceso se repitió una vez más y posteriormente se centrifugaron las muestras a 13800 rpm durante 8 minutos (NPV) ó 12 minutos (N. Acc) a 4°C. Todos estos pasos se repitieron 2 veces más.

Finalmente se decantaron los tubos y se colocaron abiertos durante 5 minutos en un concentrador bajo vacío (Eppendorf Vacufuge).

### **7. 1 Lectura del RNA total.**

Para realizar la lectura del RNA total, las muestras se resuspendieron en agua con DEPC estéril (10  $\mu$ l para NPV y 20  $\mu$ l para N. Acc); se agitaron integrando por completo el precipitado a este líquido.

Cada cubeta para espectrofotómetro (Eppendorf Bio-photometer) debió contener 98  $\mu$ l de agua milli Q estéril + 2  $\mu$ l de muestra o bien, en el caso del blanco, 98  $\mu$ l de agua milli Q estéril + 2  $\mu$ l de agua con DEPC.

La lectura se realizó a longitudes de onda de 230 nm para cuantificar las sales, 260 nm para cuantificar RNA total y 280 nm para cuantificar proteínas.

## **7. 2 Integridad del RNA.**

Para determinar la calidad del RNA total extraído, se empleó electroforesis con un gel de agarosa al 1.5%; este procedimiento permite saber si el RNA extraído es funcional para realizar la transcripción y posteriormente la reacción de la polimerasa en cadena (PCR).

El procedimiento fue el siguiente: se obtuvo la D.O con un fotómetro (Eppendorf Bio-photometer) a 230 nm para medir la cantidad de sales, a 260 nm para medir la cantidad de RNA y a 280 nm para medir la cantidad de proteínas. Las muestras que no tuvieron una relación mayor a 1.5 de la densidad óptica (D.O.) entre 260/230 y 260/280, se descartaron.

La calidad de la extracción se evaluó por medio de electroforesis con un gel de agarosa al 1.5 % determinando la integridad de la subunidades 28S y 18S del RNA ribosomal; la relación de la densidad de las dos bandas debió ser mayor a 1.5, de lo contrario, las muestras fueron descartadas.

## **7. 3 Transcripción del RNA total a DNAc.**

Las diluciones de RNA en agua con DEPC se ajustaron para NPV y N. Acc a 1.5 µg en 12 µl; para desnaturalizar las muestras, se colocaron en baño maría a 65°C durante 5 min e inmediatamente se colocaron en hielo frapé.

Posteriormente se les agregaron 20 µl de la mezcla de transcripción: 8.9 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC, 6 µl de Buffer [Tris-HCl pH 7.5, 20 mM; 100 mM NaCl; 0.1 mM EDTA; 1mM DTT; 0.01% NP-40; 50% glicerol] 3 µl de DTT, 0.6 µl de desoxinucleótidos de trifosfato (dNTP's), 1 µl de poliT y 0.5 µl de M-MLV transcriptasa reversa; y se incubaron durante 2 horas a 37°C.

## **7. 4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Mezcla para PCR.

35 µl H<sub>2</sub>O/ DEPC, 5 µl de buffer [KCl 500 mM; Tris-HCl pH 8.3 100 mM; gelatina 100 µg/ml; 1% tritón X-100; 1.5 mg/ml BSA], MgCl<sub>2</sub> (2.5 µg para N. Acc, 1.7 µg para NPV), 1 µl de dNTPs, 0.5 µl de Taq polimerasa, 1 µl de oligo sentido y 1 µl de oligo antisentido para cada gen de interés: pro-TRH (sentido: 5'- GGA CCT TGG TTG CTG TCG ACT CTG GCT TTG, antisense: ATG ACT CCT GCT CAG GTC ATC TAG AAG CT-3'); desyodasa 2 (sentido 5'- GAT GCT CCC AAT TCC AGT GT- 3', antisentido: 5'- AGG CTG GCA GTT GCC TAG TA); actina (sentido: 5'- GAC GATGCT CCCC GG GCT GTA TTC-3'; antisentido: 5'-TCT CTT GCT CTG GGC CTC GTC ACC-3') y ciclofilina (sentido: 5'- GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA-3', antisentido: 5'-ACA TGC TTG CCA TCC AGC C-3') como controles por su expresión constitutiva. Los productos amplificados tuvieron un tamaño de 350 kDa (TRH), 190 kDa (D2), 140 kDa (actina), 259 kDa (ciclofilina).

La amplificación de cada gen fue optimizada para cada estructura realizando una curva con diferente número de ciclos y observando la creciente densidad óptica (D.O). En un termociclador (Eppendorf Mastercycler gradient) se usaron las siguientes temperaturas y tiempos:

	pmol	°C	Ciclos	NPV	N. Acc
Ciclofilina	50	64		21	21
Actina	25	64		23	23
TRH	25	55		25	26
D2	25	64		29	-

Los productos de la PCR se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2% y se tiñeron con bromuro de etidio (1 mg/L) para medir la D.O con el software Advanced American Biotech Imaging.

Los resultados se reportan como la relación de la expresión del gen de interés sobre la del gen control (ciclofilina o actina) en unidades arbitrarias y considerando la del grupo control como 100%.

## **8. Determinación del contenido de pCREB por Western Blot.**

La técnica de Western Blot consiste en identificar con anticuerpos específicos, proteínas que han sido separadas de otras proteínas de acuerdo a su tamaño por electroforesis.

Las proteínas separadas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o de fluoruro de polivinilideno (PVDF) mediante la aplicación de una corriente eléctrica; entonces la membrana es una réplica del patrón de proteínas en el gel; luego la membrana es incubada o “inmuno-identificada” con un anticuerpo específico para la proteína de interés, por lo que el fundamento principal de la técnica es la interacción específica antígeno-anticuerpo en una muestra dada de proteínas.

Toda la técnica se desarrolló utilizando el equipo y componentes del Mini PROTEAN Tetra Cell (Life Sciences, Bio-RAD, CA, EUA).

### **8. 1 Preparación de los homogenados.**

Para correr las muestras de tejido en un gel es necesario lisar los tejidos y así solubilizar las proteínas para que puedan migrar individualmente en el gel separador.

Se homogenizaron (sonicador vibra cell VC-130) las muestras a baja intensidad por no más de 10 segundos con buffer de lisis RIPA (NPV con 50  $\mu$ l y N. Acc con 75  $\mu$ l; NaCl 150 mM, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, Tris 50 mM pH 8) e inhibidores de fosfatasas (PhosStop) y proteasas (cOmplete Mini) (80  $\mu$ l de cada uno/1000  $\mu$ l RIPA). Se colocaron sobre hielo frapé y se dejaron reposar durante 15 minutos; se tomaron 20  $\mu$ l para determinación de proteínas por el método de Lowry (140), y el resto se centrifugó a 13800 rpm durante 30 minutos a 4°C.

Se recuperó el sobrenadante (NPV 30  $\mu$ l y N. Acc 50  $\mu$ l) y se combinó con buffer de muestra 2X (SDS 4%, beta mercaptoetanol 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.004%, TrisHCl 0.125 M) en una relación 1:1 en tubos de 1.5 ml, éstos se colocaron en baño maría a 100°C durante 3 minutos, posteriormente se centrifugaron a 13800 rpm durante 10 minutos a 4°C y se almacenaron a -70°C hasta que se realizó la electroforesis.

## 8. 2 Determinación de proteínas por el método de Lowry.

Se tomaron 20  $\mu$ l de muestra de cada homogenado de NPV y N. Acc por duplicado y se agregaron 175  $\mu$ l de NaOH 0.5 N + 900  $\mu$ l de solución F. Se incubaron a temperatura ambiente por 25 minutos cubiertos con aluminio y se agregaron 100  $\mu$ l de Folin-Ciocalteu 1 N. Se incubaron en el periodo de 30 minutos y se leyeron en el espectrofotómetro a 570 nm.

La curva estándar se elaboró con 5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu$ g de albúmina sérica bovina (BSA); los tubos se llenaron de la siguiente manera:

BSA	0 $\mu$ g	5 $\mu$ g	10 $\mu$ g	15 $\mu$ g	20 $\mu$ g	40 $\mu$ g	60 $\mu$ g	80 $\mu$ g	100 $\mu$ g
Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
H <sub>2</sub> O	150	145	140	135	130	110	90	70	50
BSA	-	5	10	15	20	40	60	80	100
NaOH	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
Solución F	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l

Solución F o reactivo de cobre: 50 ml de solución A (carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N) + 0.5 ml de solución B (sulfato cúprico al 1%) + 0.5 ml de solución C (tartrato de Na y K al 2%).

## 8. 3 Preparación de los geles de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS).

Luego de ensamblar los vidrios y las minicámaras, se vertieron las mezclas correspondientes al gel separador (10 ml; 7.65 ml H<sub>2</sub>O Milli Q, 3.75 ml, 3.45 ml mezcla de acrilamida/bisacrilamida (30%/2.7%; w/v), TrisHCl 1.5 M pH 8, 0.75 ml SDS 20%, 0.75 ml persulfato de amonio (APS) 10 %, TEMED 0.001 ml). Los reactivos se agregaron uno a uno en agitación continua y el APS y TEMED justo antes de vaciar la mezcla en el módulo de ensamblaje.



Posteriormente se agregaron 200  $\mu$ l de isopropanol al 100%, mismo que se retiró utilizando papel filtro (Wattman) alrededor de 20 minutos después, cuando la mezcla se había solidificado.

En el mismo módulo, sobre el gel separador se agregó la mezcla del gel concentrador (3.075 ml H<sub>2</sub>O MilliQ, 1.25 ml, 0.67 ml mezcla acrilamida/bisacrilamida 30%/0.8%, w/v; TrisHCl pH 6.8, 0.025 ml SDS 20%, 0.025 ml APS 10%, 0.005 ml TEMED) añadiendo los reactivos de la misma manera que al preparar el gel separador; inmediatamente después se colocaron peines de 10 pozos (1 mm/pozo) en cada módulo de ensamblaje. La mezcla se solidificó alrededor de 30 minutos después.

#### 8. 4 Electroforesis.

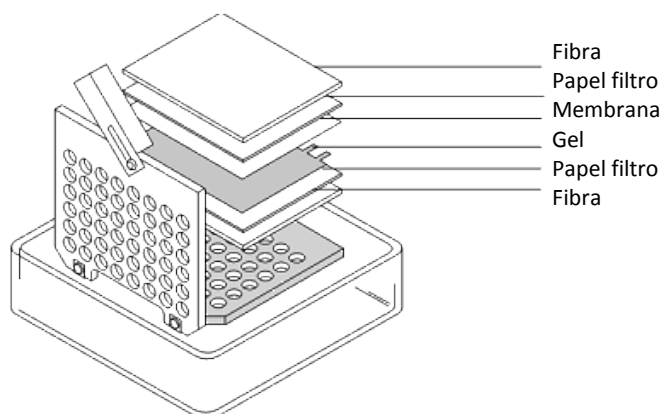
Los geles se colocaron en las cámaras de corrida llenas con buffer de corrida (3 g TrisHCl, 14.4 g glicina, 10 ml SDS 10%, aforado a 1 L con H<sub>2</sub>O MilliQ), después de retirar los peines de los geles.

Se corrió la electroforesis a 50 Volts durante 10 minutos y luego a 130 Volts durante una hora y media o hasta que el desplazamiento del marcador se acercara al extremo inferior del gel.

#### 8. 5 Transferencia.

La transferencia del gel de poliacrilamida a la membrana de PVDF (Amersham, RU) se realizó de la siguiente manera:

Una membrana de 8.5 x 7.5 cm se sumergió en metanol durante 1 min y luego en H<sub>2</sub>O MilliQ durante 3 minutos, finalmente se colocó en buffer de transferencia (3.02 g Tris 0.025 Mm, 14.4 g glicina, 100 ml metanol 99.93%, aforado a 1 L con H<sub>2</sub>O MilliQ). Posteriormente se preparó el cassette de transferencia de la siguiente forma:



El cassette se sumergió en la cámara de transferencia llena con buffer de transferencia y se programaron 175 mA durante una hora y media.

## 8. 6 Anticuerpos.

<b>Anticuerpos primarios*</b>			
<b>Proteína</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Marca</b>
Actina	Policlonal de ratón	1: 3000	Cortesía del Dr. José Manuel Hernández Hernández (CINVESTAV Zacatenco, México)
pCREB (Ser133)	Policlonal de conejo	1: 3000	Millipore (Darmstadt, Alemania)
CREB	Policlonal de conejo	1:3000	Millipore (Darmstadt, Alemania)
<b>Anticuerpos secundarios (conjugados con peroxidasa de rábano)*</b>			
<b>Proteína</b>	<b>Especie</b>	<b>Dilución</b>	<b>Marca</b>
IgG	Cabra anti conejo	1: 40000	Santa Cruz (CA, EUA)
IgG	Cabra anti ratón	1: 35000	Santa Cruz (CA, EUA)

Diluyente: solución bloqueadora (BSA al 5% (Sigma Aldrich) en PBS 1X (100 ml PBS 10x (82 g NaCl, 4.3 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 17.4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> aforado a 1 L con H<sub>2</sub>O MilliQ) en 900 ml H<sub>2</sub>O MilliQ)).

Antes de poder incubar las membranas con los anticuerpos éstas se colocaron en 25 ml de solución bloqueadora (albúmina sérica bovina al 5% (Sigma Aldrich) en PBS 1X (100 ml PBS 10X (82 g NaCl, 4.3 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 17.4 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> aforado a 1 L con H<sub>2</sub>O MilliQ) en 900 ml H<sub>2</sub>O MilliQ con Tween 20 (Bio-Rad) al 0.05%) durante una hora en agitación moderada a temperatura ambiente.

Posteriormente se hicieron lavados para retirar la solución bloqueadora; la membrana se sumergió en PBS 1X y se agitó intensamente durante 10 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el PBS 1X y se colocó un nuevo volumen que se agitó durante 15 minutos con intensidad moderada, este último paso se repitió dos veces más.

Luego de retirar el último volumen de PBS 1X de lavado, se adicionaron 10 ml de la dilución de anticuerpo primario seleccionado, se agitó durante 10 minutos a intensidad moderada y luego se guardó a 4°C durante 24 horas.

Una vez transcurrido este tiempo, se hizo una serie de lavados como los mencionados anteriormente, se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario, una nueva serie de lavados y la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente durante una hora. Posteriormente se llevó a cabo el revelado.

### **8. 7 Revelado.**

En un cuarto de revelado, en condiciones de obscuridad total o penumbra (foco rojo de 8 Watts) se adicionaron a las membranas 1 ml de reactivo A (luminol) y 1 ml de reactivo B (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (ImmunoCruz, Santa Cruz, CA, EUA) y se agitaron suavemente durante 2 minutos.

Después de remover cuidadosamente el exceso de reactivo, se colocaron las membranas en el cassette de revelado, una mica y luego la placa fotográfica (Kodak Biomax MR Film).

Las placas fueron expuestas 10 y 30 minutos. Transcurrido cada uno de los intervalos, en total oscuridad, se removió la placa y se colocó durante 8 segundos en el revelador (Kodak Professional Developer [KP123546A], NY, EUA), luego en agua corriente durante 8 segundos, luego en fijador (Kodak Professional Fixer [KP116691A], NY, EUA) durante el mismo tiempo y nuevamente en agua.

### **8. 8 Stripping.**

Después del revelado, las membranas fueron sometidas al proceso de “stripping” por el cual se removieron los anticuerpos a los que se les habían expuesto y estuvieron listas para ser incubadas con otro anticuerpo primario. Este proceso consistió en agregar solución de stripping (PBS 1X, Tween 20 al 0.25%) y agitar a intensidad moderada, posteriormente se realizaron 5 lavados con agua desionizada y finalmente con PBS 1X. Se procedió a bloquear la membrana con solución bloqueadora y a incubar nuevamente con el anticuerpo primario de interés.

Cada membrana fue expuesta a los anticuerpos primarios anti CREB, anti pCREB y anti actina y a sus respectivos anticuerpos secundarios, realizando el proceso de stripping entre cada uno de ellos después del revelado.

### **8. 9 Análisis de las placas.**

El análisis de las bandas de proteínas obtenidas en las placas se realizó utilizando el software ImageJ (NIH Image, Research Services Branch of National Institutes of Health) que permite calcular la densidad óptica (D.O) de un área determinada en una imagen.

Las imágenes de las placas fotográficas fueron digitalizadas colocándolas sobre un negatoscopio y fotografiándolas con una cámara fotográfica digital (Sony CyberShot W800).

Los resultados se expresan como:

D.O de la banda correspondiente a la proteína de interés (CREB o pCREB)

D.O de la banda correspondiente a la proteína control (actina)

Y en el caso de pCREB, como la relación entre CREB y pCREB:

D.O de la banda correspondiente pCREB

D.O de la banda correspondiente a CREB

### **9. Análisis estadísticos**

Los datos (cambios bioquímicos y conductuales) de la determinación de la dosis efectiva de inhibidor se analizaron por ANOVA de una vía, y cuando hubo diferencia significativa se realizó una prueba post-hoc de Fisher.

Los datos del curso temporal del inhibidor (tres dosis por vía i.p) en animales control; la comparación del consumo de alimento y peso corporal en cada día, entre grupos (control, control inhibidor, anorexia, anorexia inhibidor); así como el ED entre grupos con inyección de TRH o de inhibidor en el N. Acc se analizaron con la prueba *t* de Student, comparando

entre cada grupo inyectado con fármaco vs su propio control (un grupo control por cada tiempo).

Para comparar cambios en la expresión de TRH, consumo de alimento, ED entre grupos control y AID inyectados con vehículo o inhibidor, se utilizó un ANOVA de dos vías, donde los factores fueron grupos (control y AID) y tratamientos (inyección con vehículo o con inhibidor). Se consideró una diferencia significativa cuando  $p \leq 0.05$ .

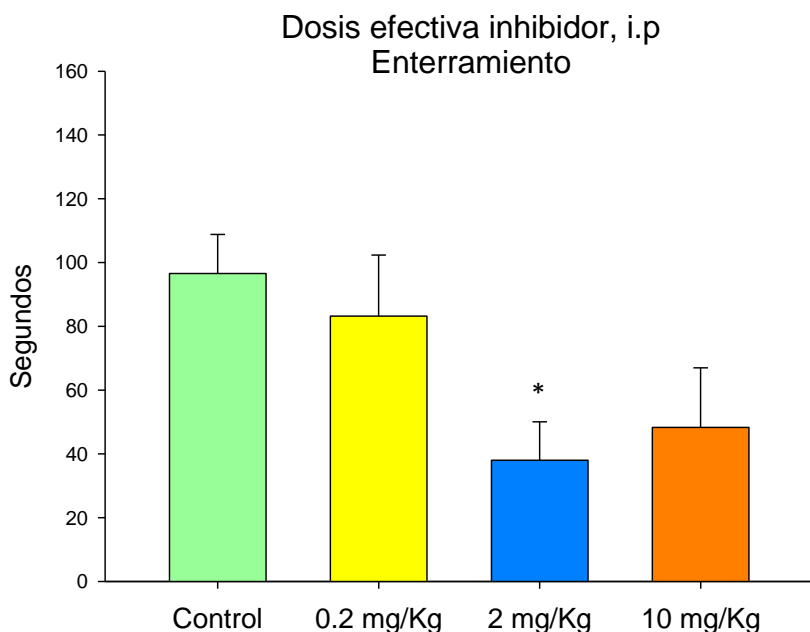
## **IX. RESULTADOS.**

### **El inhibidor de PDE7B tiene efecto ansiolítico a dosis de 2 mg/Kg, i.p.**

En este experimento se probaron 3 dosis diferentes de inhibidor usando como referencia el trabajo de Nandhakumar y cols. (89, 90) en un protocolo de epilepsia en ratas donde se observó un efecto protector; ésta es una de las pocas referencias del uso del inhibidor *in vivo*.

Elegimos un valor 10 veces menor que la dosis utilizada por Nandhakumar (89, 90) y otro 5 veces mayor, bajo la consideración de que posiblemente 20 mg/Kg podrían carecer de un efecto más significativo que el que podríamos observar con 10 mg/Kg.

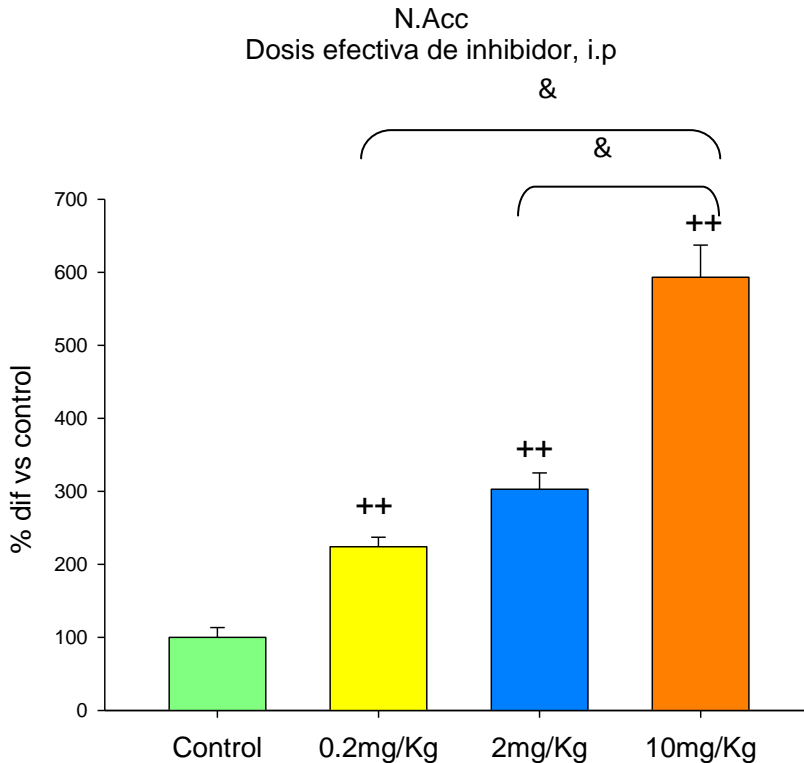
El ANOVA de una vía arrojó que el tiempo de enterramiento observado fue significativamente menor que el del grupo control ( $39.34 \pm 12.50\%$ ,  $F_{(3,22)} = 3.332$ ;  $p < 0.05$ ) en los animales inyectados con 2 mg/Kg de inhibidor. No se observó una disminución significativa del tiempo de enterramiento con la dosis de 0.2 mg/Kg ni con la de 10 mg/Kg (Gráfica 1).



**Gráfica 1.** Tiempo de enterramiento en la prueba de ED, con tres diferentes dosis i.p de inhibidor: 0.2 mg/Kg, 2 mg/Kg y 10 mg/Kg, administrada 30 minutos antes de la prueba; los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la misma. Los valores son la media expresada en segundos  $\pm$  EEM; \* $p < 0.05$  vs el control;  $n = 8$ /grupo.

**La disminución en el tiempo de enterramiento coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc.**

En el N. Acc, la expresión del RNAm de TRH aumentó con las 3 dosis con respecto al grupo inyectado con vehículo. Con 0.2 mg/Kg, la expresión se incrementó al  $224.2 \pm 7.5\%$ ; con 2 mg/Kg al  $303 \pm 15.8\%$  y con 10 mg/Kg al  $593.26 \pm 31.06\%$  comparando con el control:  $100 \pm 6.8\%$ . El ANOVA de una vía arrojó un efecto significativo  $F_{(3,7)} = 233.96$   $p < 0.0001$ ; la prueba post-hoc de Fisher mostró que la expresión de TRH por la inyección de las diferentes dosis también fue diferente entre ellas (Gráfica 2).



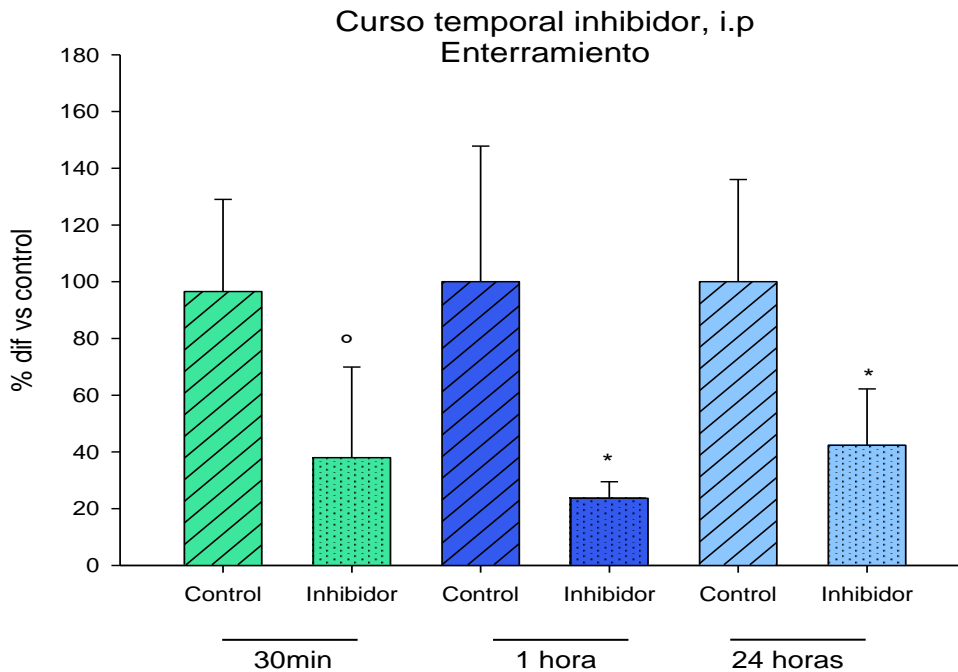
**Gráfica 2.** Expresión del RNAm de TRH en el N. Acc, resultante de la administración i.p de tres diferentes dosis de inhibidor: 0.2 mg/Kg, 2 mg/Kg o 10 mg/Kg, administrada 30 minutos antes del ED; los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la prueba. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia vs el control (100%)  $\pm$  EEM y son la relación de la D.O del DNAc de TRH respecto a la D.O del DNAc de actina ++ $p < 0.0001$  vs el control; & $p < 0.0001$  vs 10 mg/Kg (n=4/grupo).

### El efecto ansiolítico del inhibidor dura hasta 24 horas.

Una vez comprobado que la dosis efectiva de inhibidor con un efecto ansiolítico fue de 2 mg/Kg, realizamos un curso temporal para conocer la duración de dicho efecto.

Se observó un efecto ansiolítico significativo del inhibidor con respecto al grupo control en todos los tiempos probados; la prueba de *t* de Student mostró diferencias entre el grupo inyectado con inhibidor vs el de vehículo a la media hora ( $39.3 \pm 12.5\%$  vs  $100 \pm 12.7\%$ ;  $t=3.404$ ,  $p < 0.01$ ), entre los de una hora ( $23.7 \pm 2.4\%$  vs  $100 \pm 21.4\%$ ;  $t=2.66$ ,  $p < 0.05$ ); y

también entre los de 24 horas después ( $42.3 \pm 8.9\%$  vs  $100 \pm 18\%$ ;  $t=3.07$ ,  $p<0.05$ ), (Gráfica 3).

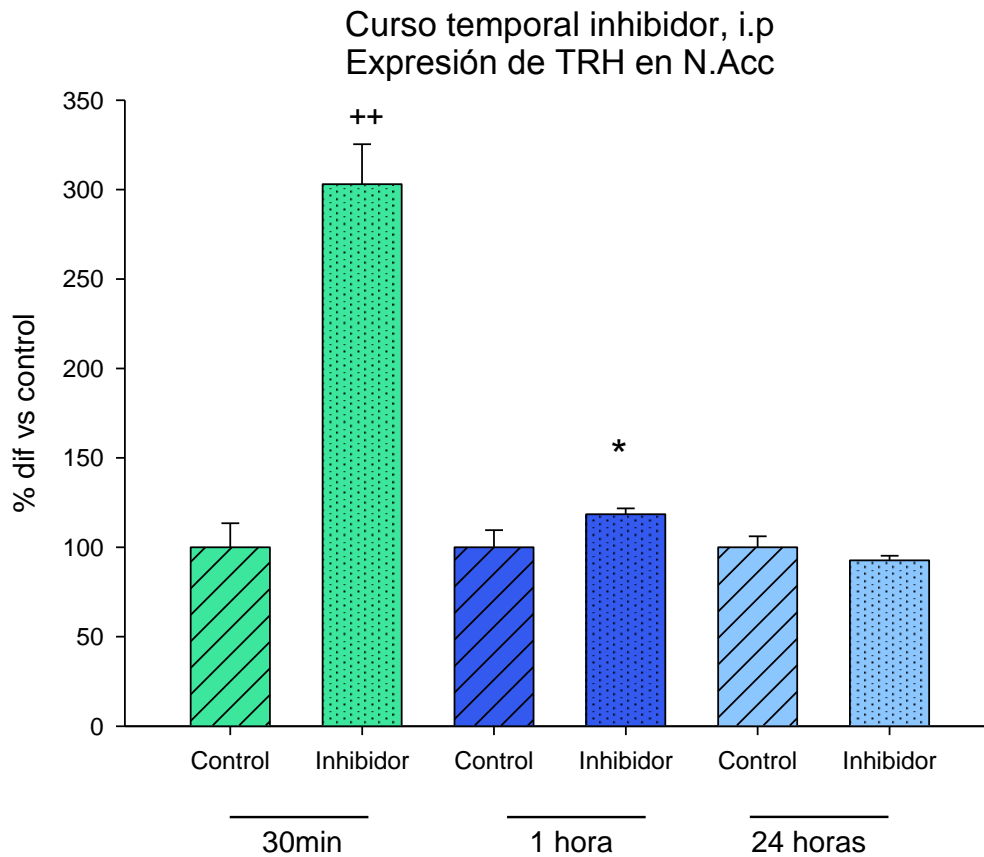


**Gráfica 3.** Tiempo de enterramiento en la prueba de ED expresado en porcentaje de diferencia con respecto al control correspondiente, usando 2 mg/Kg, i.p de inhibidor, administrado 30 minutos, 1 hora o 24 horas antes de la prueba; los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la misma. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia vs el control ( $100\% \pm \text{EEM}$ ; ° $p<0.01$ , \* $p<0.05$  contra su respectivo control, ( $n=5/\text{grupo}$ )).

**La disminución en el tiempo de enterramiento coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc., 30 minutos y una hora después de administrar el inhibidor.**

La prueba de *t* de Student sobre los datos de la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc tras la inyección del fármaco, arrojó que hubo un aumento media hora después de la inyección respecto a su control ( $303.0 \pm 16.8\%$  vs  $100 \pm 6.7\%$ ;  $t=-14.495$ ,  $p<0.0001$ ); después de una hora también hubo diferencia ( $118.4 \pm 1.6\%$  vs  $100 \pm 5.5\%$ ;  $t=-3.68$ ,  $p<0.05$ ), y 24 horas después los valores fueron similares (Gráfica 4).



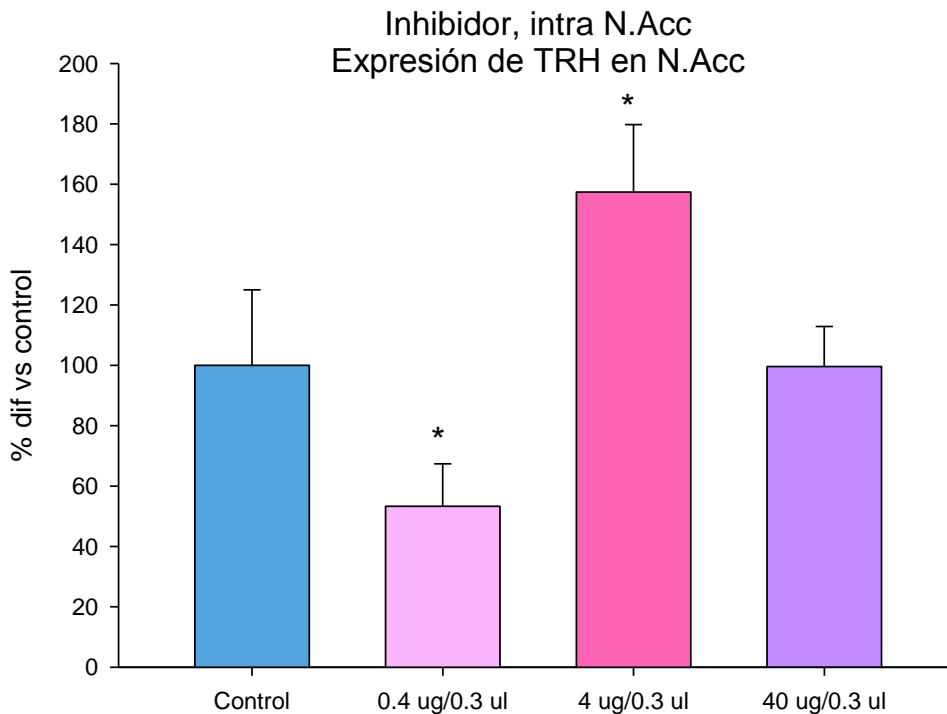


**Gráfica 4.** Expresión del RNAm de TRH en el N. Acc, tras la administración i.p de 2 mg/Kg de inhibidor, 30 minutos, 1 hora o 24 horas antes del ED; los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la prueba. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control correspondiente (100%)  $\pm$  EEM; ++ $p < 0.0001$ , \* $p < 0.05$ ;  $n = 4$ /grupo.

**La administración de inhibidor de PDE7B en el N. Acc aumenta la expresión del RNAm de TRH en esa región.**

Los datos de la expresión de TRH en el NAcc entre el grupo con inyección de 0.4 $\mu$ g/0.3 $\mu$ l del inhibidor vs el grupo con vehículo fueron menores (53.3  $\pm$  8.09% vs 100  $\pm$  6.8%;  $t = 4.128$ ,  $p < 0.05$ ); utilizando la dosis intermedia 4  $\mu$ g/0.3  $\mu$ l de inhibidor, la expresión de TRH fue significativamente mayor (157.4  $\pm$  15.8% vs 100  $\pm$  6.8%;  $t = -3.904$ ,  $p < 0.05$ ) respecto al control. La dosis más alta no tuvo efecto. Cada dosis contó con su propio

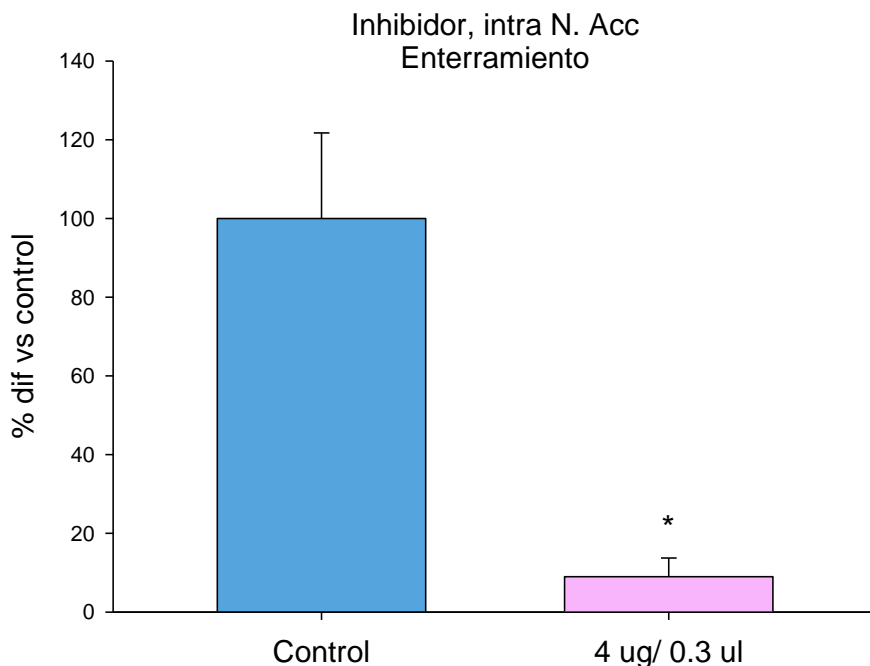
grupo control, los datos de los tres grupos control se promediaron para graficar uno solo. (Gráfica 5).



**Gráfica 5.** Expresión del RNAm de TRH en el N. Acc, después de la inyección bilateral intra N. Acc de tres diferentes dosis de inhibidor (0.4  $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$ ), 24 horas antes de la prueba de ED. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la prueba. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el control cuando \* $p < 0.05$ ;  $n = 4/\text{grupo}$ .

### **La administración del inhibidor de PDE7B en el N. Acc disminuye el tiempo de enterramiento.**

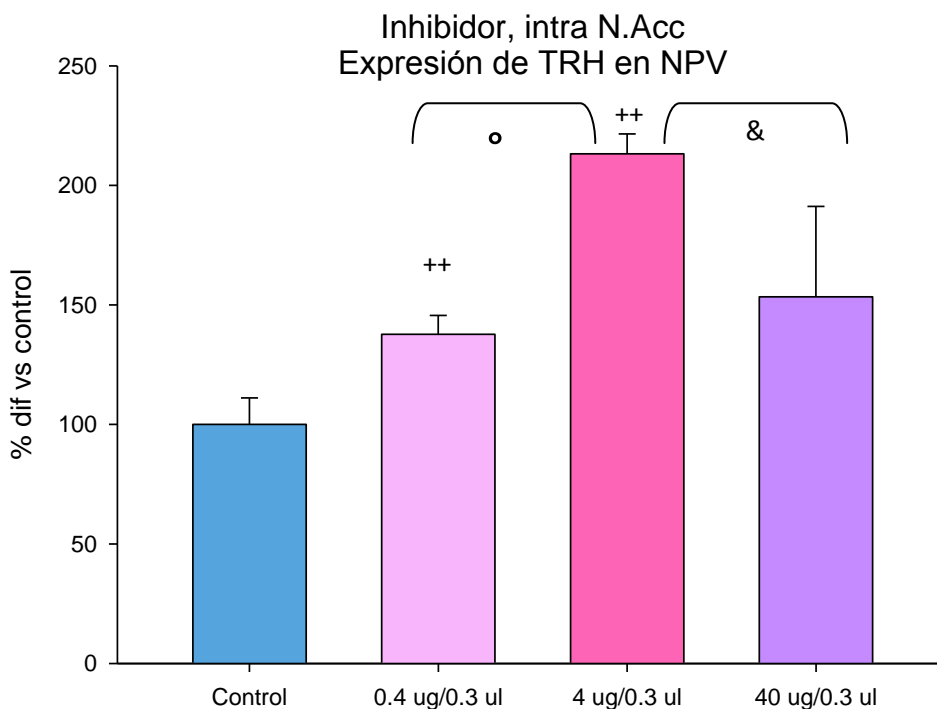
Tras inyectar 4  $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$  de inhibidor directamente en el N. Acc, se observó una disminución en el tiempo de enterramiento en el grupo tratado con el fármaco respecto al control inyectado con vehículo (8.9  $\pm$  2.3% vs 100  $\pm$  10.8%;  $t = 3.03$ ,  $p < 0.05$ ), (Gráfica 6).



**Gráfica 6.** Tiempo de enterramiento en la prueba de ED expresado como porcentaje respecto al control, usando 4  $\mu\text{g}$  de inhibidor intra N. Acc, administrada bilateralmente 30 minutos antes de la prueba; los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la misma. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el control cuando  $*p < 0.05$ ;  $n = 4/\text{grupo}$ .

**La administración del inhibidor de PDE7B en el N. Acc también aumenta la expresión del RNAm de TRH en el NPV.**

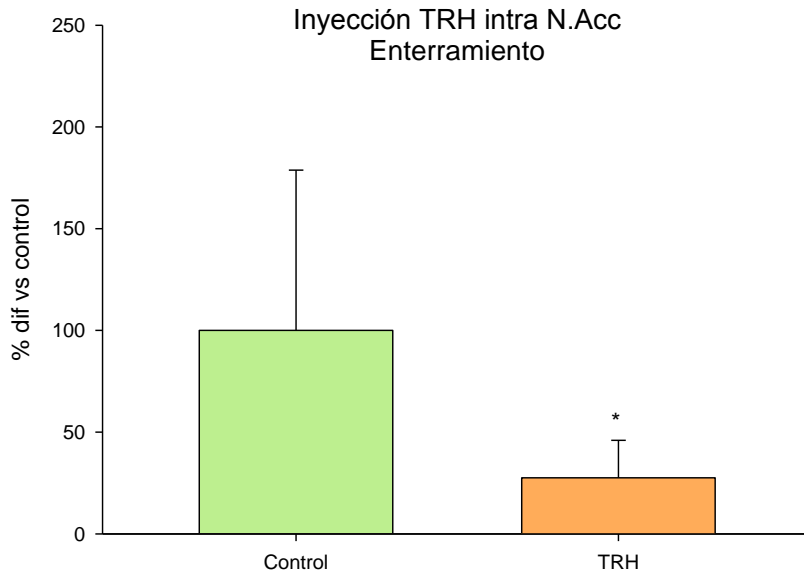
Los cambios en la expresión de TRH del NPV tras la administración de inhibidor intra N. Acc fueron los siguientes: el ANOVA de una vía mostró efecto de la dosis  $F_{(3,14)} = 33.57$ ,  $p < 0.0001$ , observándose un aumento con la dosis de 0.4  $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$  y con la de 4  $\mu\text{g}/0.3 \mu\text{l}$  ( $137.71 \pm 3.9$  y  $213.2 \pm 4.8\%$  vs  $100 \pm 3.9\%$ ), (Gráfica 7).



**Gráfica 7.** Expresión del RNAm de TRH en el NPV, después de la inyección bilateral intra N. Acc de tres diferentes dosis de inhibidor (0.4 µg/0.3 µl, 4 µg/0.3 µl, 40 µg/0.3 µl), 24 horas antes de la prueba de ED. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la prueba. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%) ± EEM. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el control cuando ++p<0.0001; °p<0.01 y &p<0.0001 vs 4 µg/0.3 µl; n=4/grupo.

#### **Inyección de TRH intra N. Acc.**

La inyección aguda de TRH en el N. Acc parece tener un efecto ansiolítico (27.6 ± 6.9% vs 100 ± 32.1%;  $t=2.37$ ,  $p<0.05$ ) en comparación con la inyección de vehículo salina, en la prueba de ED al ser inyectado media hora antes de ésta (Gráfica 8).

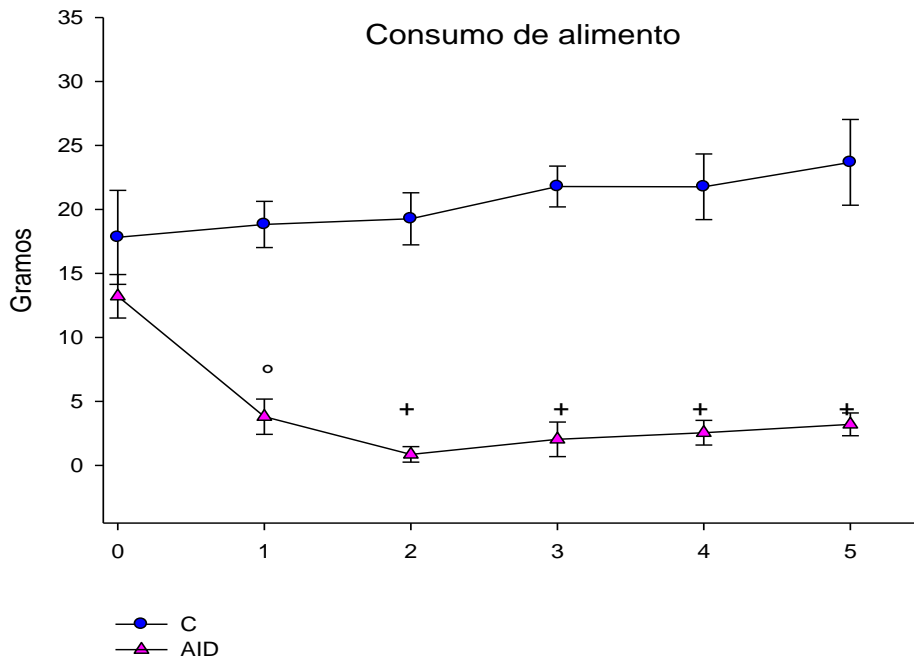


**Gráfica 8.** Tiempo de enterramiento en la prueba de ED expresado como porcentaje de diferencia respecto al control. TRH (0.3  $\mu\text{g}/0.5 \mu\text{l}$ ) fue administrado unilateralmente 30 minutos antes de la prueba; los animales fueron sacrificados 30 minutos después de la misma. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el control cuando \* $p < 0.05$ ,  $n = 4/\text{grupo}$ .

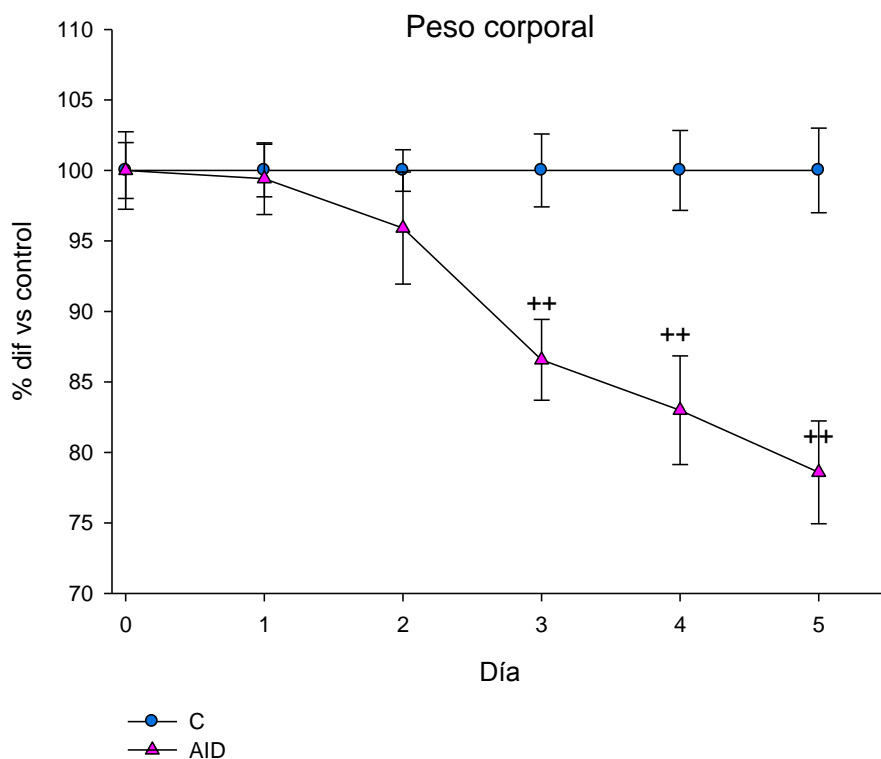
### Modelo de AID.

#### El consumo de alimento y el peso corporal disminuyen significativamente en el modelo de AID.

El consumo de alimento de los animales sometidos al modelo de AID disminuyó significativamente respecto al control (C) a partir del primer día del modelo (AID:  $11.9 \pm 3.9$  vs C:  $19.0 \pm 7.7$ ; día 1,  $t = 6.64$ ,  $p < 0.0001$ ; día 2  $t = 8.9$ ,  $p < 0.0001$ ; día 3  $t = 9.98$ ,  $p < 0.0001$ ; día 4  $t = 18.92$ ,  $p < 0.0001$ ) y el peso corporal desde el tercer día (AID:  $85.6 \pm 2.8$  vs C:  $203.7 \pm 17.0$ ; día 3  $t = 4.495$ ,  $p < 0.001$ ; día 4  $t = 5.137$ ,  $p = 0.0001$ ; día 5  $t = 6.427$ ,  $p < 0.0001$ ). Se muestran los promedios del grupo C y AID. La inyección i.p del inhibidor fue aguda durante el último día del modelo y el consumo de alimento posterior a ésta se presenta en una gráfica por separado (Gráficas 9 y 10).



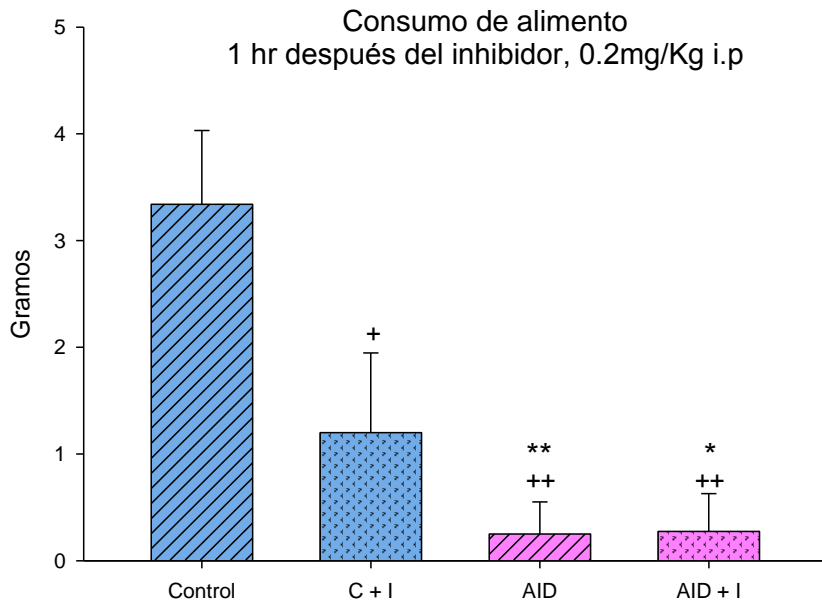
**Gráfica 9.** Consumo de alimento durante los 5 días del modelo de AID. El alimento consumido fue cuantificado cada día en el mismo horario. Los valores son la media expresada en gramos  $\pm$  EEM. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el control cuando <sup>°</sup> $p < 0.01$ , <sup>+</sup> $p < 0.001$ ;  $n = 8$ /grupo.



**Gráfica 10.** Peso corporal durante los 5 días del modelo de AID. El peso de los animales y del alimento consumido fue cuantificado cada día en el mismo horario. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM. La prueba de t mostró diferencia significativa  $++p < 0.0001$ ;  $n = 8/\text{grupo}$ .

**La dosis baja de inhibidor (0.2 mg/Kg, i.p) disminuye el consumo de alimento en animales control.**

Se observó una disminución en el consumo del grupo control + inhibidor (C+I) ( $42.6 \pm 10.0\%$ ) contra el C ( $100 \pm 20.6\%$ ). El ANOVA de dos vías mostró efecto de grupo (animales C o bien, AID) ( $F_{(1,20)} = 86.69$ ,  $p < 0.0001$ ), efecto del tratamiento (inyectados con vehículo o con inhibidor) ( $F_{(1,20)} = 25.2$ ,  $p < 0.0001$ ) y una interacción significativa entre ambos factores ( $F_{(1,20)} = 21.5$ ,  $p < 0.001$ ). No se observaron diferencias entre los grupos AID y AID+I aunque su consumo fue, como se esperaba, significativamente menor que el del grupo C ( $0.5 \pm 0.3$  y  $0.6 \pm 0.3$  vs  $3.3 \pm 0.3$ ), (Gráfica 11).



**Gráfica 11.** Consumo de alimento durante una hora después de la inyección i.p de 0.2 mg/Kg de inhibidor o de vehículo en el quinto día del modelo de AID. Los valores son la media expresada en gramos  $\pm$  EEM. ANOVA de dos vías estadísticamente significativo contra el control cuando  $+p<0.001$ ,  $++p<0.0001$  vs C;  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$  vs C+I,  $n=8$ /grupo.

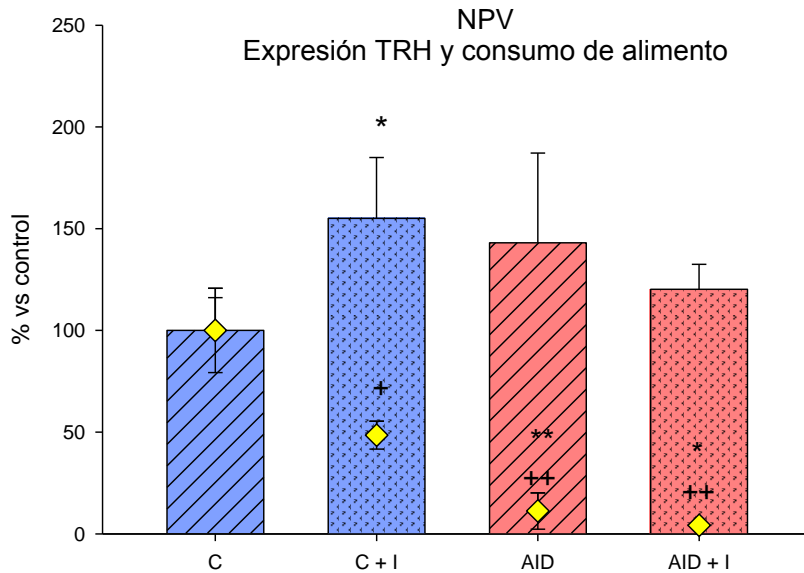
**La disminución en el consumo de alimento en animales control coincide con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el NPV, semejándose al modelo de AID.**

En cuanto a la expresión de TRH, la inyección del inhibidor estuvo asociada con un aumento en el grupo C+I respecto al grupo C ( $155.0 \pm 13.4\%$  vs  $100 \pm 12.4\%$ ) según el ANOVA de dos vías.

El ANOVA de dos vías mostró efecto del tratamiento (inyectados con vehículo o con inhibidor) ( $F_{(1,13)} = 5.6$ ;  $p<0.05$ ) y una interacción significativa entre el grupo (C o AID) y el tratamiento ( $F_{(1,13)} = 7.54$ ;  $p<0.05$ ). Además hubo una tendencia a la alta en la expresión del péptido en los grupos AID y AID+I respecto al grupo C.

Se grafica además, con diamantes amarillos, el ya mencionado (Fig. 10) consumo de alimento en porcentaje respecto al grupo C (Gráfica 12).





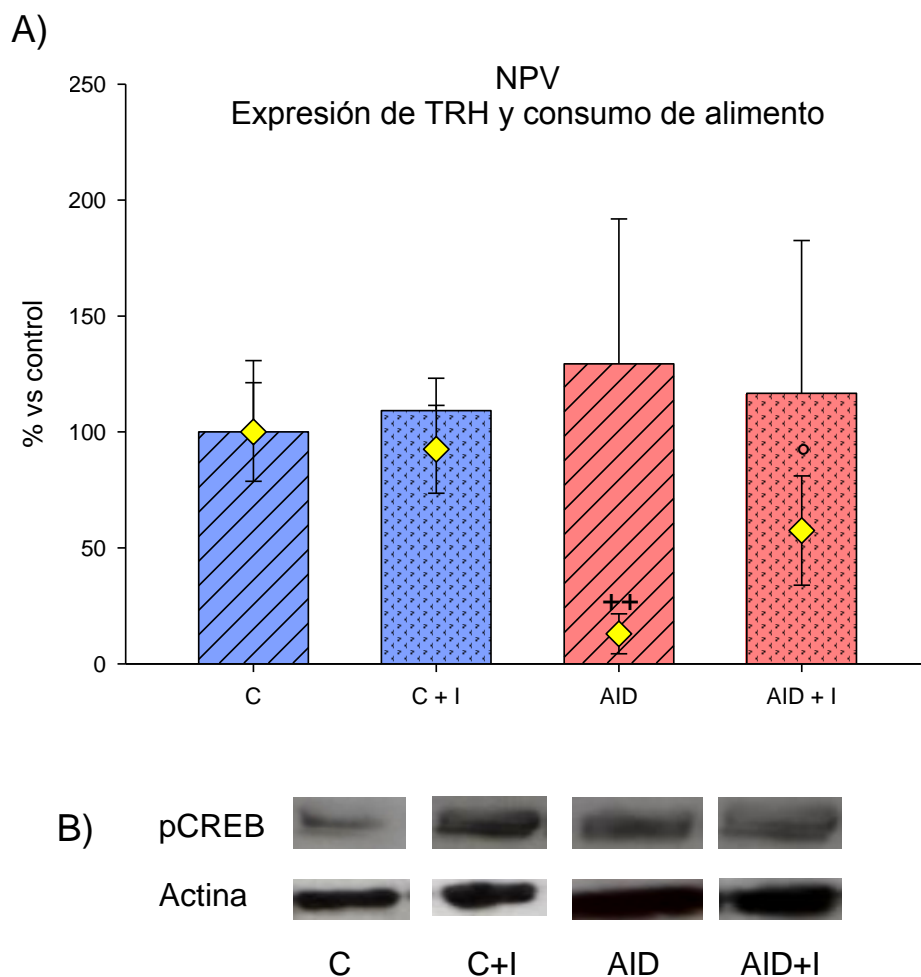
**Gráfica 12.** Expresión del RNAm de TRH en el NPV de animales C, C+I, AID y AID+I y su consumo de alimento. Los animales fueron sacrificados 30 minutos después de someterlos a la prueba de ED. RNAm de TRH (n=4/grupo) se muestra en barras; el consumo de alimento (n=8/grupo) se muestra en diamantes. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%) ± EEM.

Expresión de TRH: ANOVA de dos vías estadísticamente significativo contra C cuando \* $p < 0.01$ . Consumo de alimento: ANOVA de dos vías estadísticamente significativo cuando + $p < 0.001$ , ++ $p < 0.0001$  vs C; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs C+I.

**Una dosis mayor de inhibidor (2mg/Kg) no modifica el consumo de alimento en animales control pero lo aumenta en animales AID.**

Como se observa en la serie de diamantes, no hubo diferencias en el consumo de alimento entre el grupo C y el grupo C+I, sin embargo, el consumo de AID+I fue significativamente mayor que el de AID (500 ± 161.24% vs 100 ± 44.72%). Como se esperaba, el consumo del grupo AID fue significativamente menor respecto al grupo C (28.4 ± 13.9% vs 100 ± 10.6%). El ANOVA de dos vías mostró efecto de grupo (C o AID) ( $F_{(1,16)} = 46.59$ ;  $p < 0.0001$ ) e interacción significativa de factores (grupo y administración de vehículo o de inhibidor) ( $F_{(1,16)} = 8.45$ ;  $p < 0.05$ ).

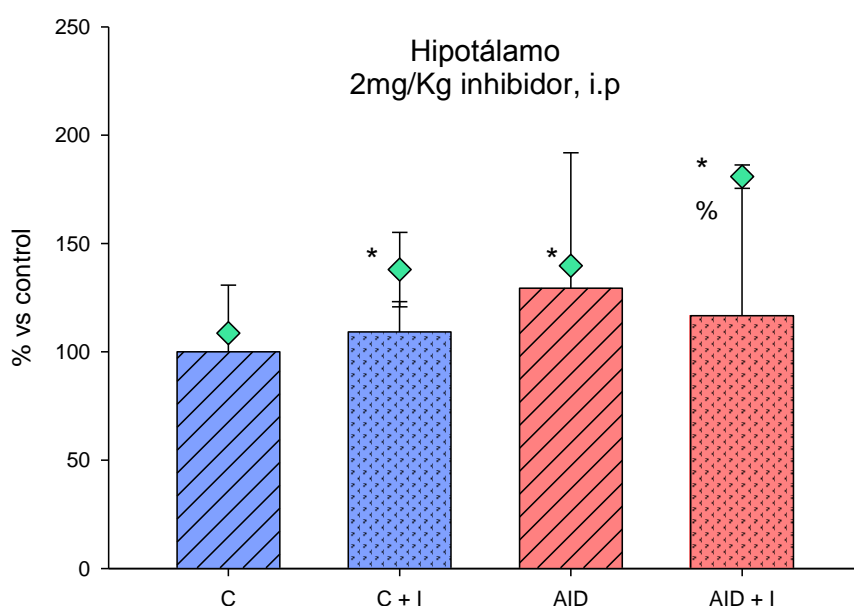
La inyección del inhibidor no indujo cambios en la expresión de TRH respecto al control correspondiente (C+I vs C, AID+I vs AID) y tampoco se observaron diferencias significativas entre C y AID (Gráfica 13).



**Gráfica 13. A)** Expresión del RNAm de TRH en el NPV de animales C, C+I, AID y AID+I. Los animales fueron sacrificados después de someterlos a la prueba de ED. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%) ± EEM. RNAm de TRH (n=4/grupo) se muestra en barras; conducta alimentaria (n=5/grupo) se muestra en diamantes. ++p<0.0001, °p<0.05. **B)** Contenido de pCREB en NPV de los grupos C, C+I, AID y AID+I, determinada por Western Blot; n=2/grupo.

### La expresión de D2 en el hipotálamo aumenta por la inhibición de PDE7 (2 mg/Kg, i.p).

Se evaluó también la expresión del RNAm de la D2 en el hipotálamo y se encontró que ésta aumentó en el grupo C+I ( $137.960 \pm 9.914\%$ ,  $0.701 \pm 0.050$ ), A ( $139.713 \pm 0.861\%$ ,  $0.709 \pm 0.004$ ) y A+I ( $180.868 \pm 3.822\%$ ,  $0.918 \pm 0.019$ ) respecto al grupo C ( $100 \pm 8.601\%$ ,  $0.508 \pm 0.044$ ) y en el grupo A+I respecto al grupo A ( $0.709 \pm 0.004$  vs  $0.918 \pm 0.019$ ). El ANOVA de dos vías mostró efecto de tratamientos  $F_{(1,9)} = 4.98$ ,  $p=0.05$  (Gráfica 14).

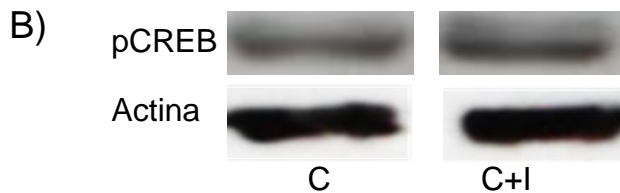
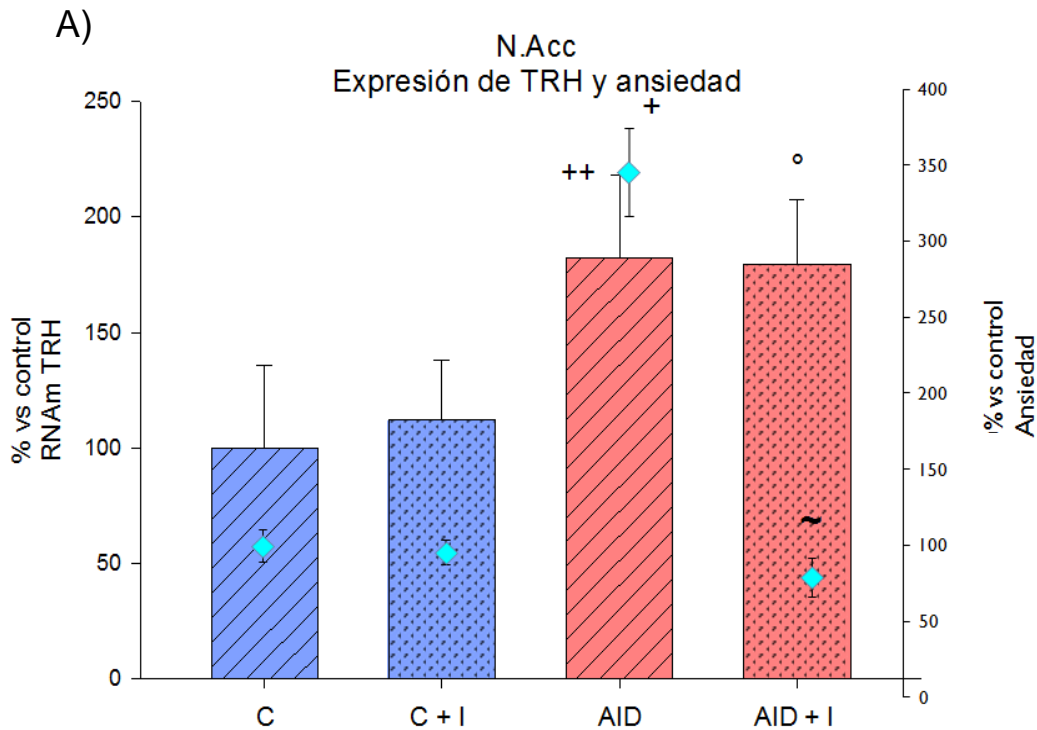


**Gráfica 14.** Expresión del RNAm de TRH y de D2 en hipotálamo de animales C, C+I, AID y AID+I. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM; RNAm de TRH (n = 4/grupo) barras; RNAm de D2 (n = 4/grupo) diamantes. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el control inyectado con vehículo cuando  $*p<0.05$  o contra el grupo A cuando  $\%p<0.05$ ; n=4/grupo.

**La dosis baja de inhibidor (0.2 mg/Kg) disminuye el tiempo de enterramiento en animales AID pero no en animales control.**

En la serie de diamantes se muestra la conducta de ansiedad, que fue significativamente mayor en el grupo AID respecto al grupo C ( $345.5 \pm 129.94\%$  vs  $100 \pm 36.78\%$ ;  $F_{(3,22)} = 5.934$ ;  $p < 0.001$ ). Se observó una disminución en la conducta de ansiedad de los animales AID+I respecto al grupo AID ( $22.9 \pm 3.5\%$  vs  $100 \pm 14.6\%$ ). El ANOVA de dos vías mostró efecto de grupo ( $F_{(1,22)} = 7.53$ ;  $p < 0.05$ ) y de tratamiento ( $F_{(1,22)} = 9.8$ ;  $p < 0.01$ ).

Como se muestra en las barras, no se encontraron diferencias en la expresión de TRH en el N. Acc entre el grupo C y C+I. Sin embargo, sí hubo una mayor expresión del péptido en los grupos AID y AID+I respecto al grupo C ( $182.3 \pm 15.9\%$  y  $179.6 \pm 14.0\%$  vs  $100 \pm 16.1\%$ ). No hubo diferencia entre los grupos AID y AID+I. El ANOVA de dos vías mostró efecto de grupo ( $F_{(1,15)} = 25.7$ ,  $p < 0.0001$ ) (Gráfica 15: A y B).



**Gráfica 15. A)** Expresión del RNAm de TRH en el N. Acc de animales C, C+I, AID y AID+I. Los animales fueron inyectados con vehículo o inhibidor (0.2 mg/Kg, i.p) y sacrificados 30 minutos después de someterlos a la prueba de ED. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM. RNAm de TRH (n=4/grupo) se muestra en el eje vertical primario o barras, la conducta de enterramiento (n=8/grupo) se muestra en el eje vertical secundario o diamantes.

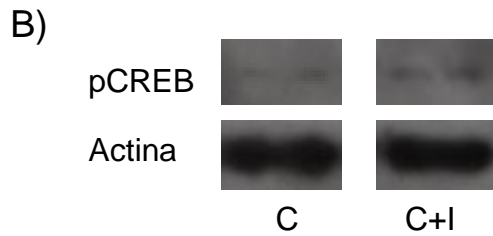
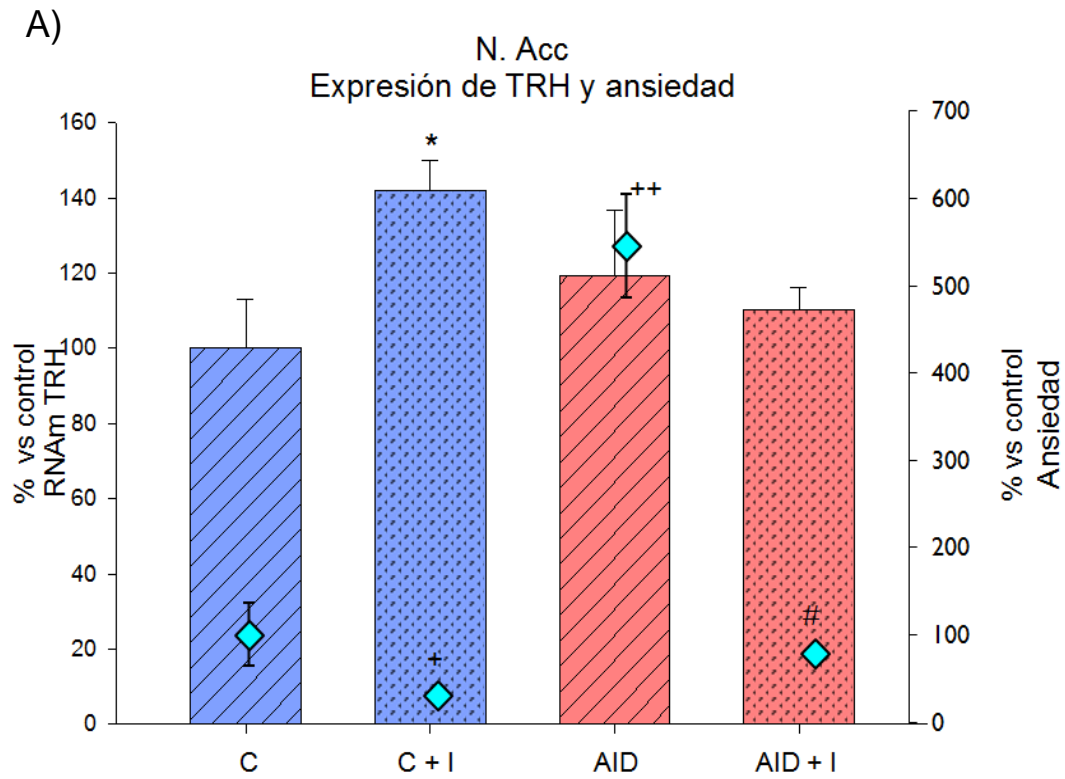
En cuanto a la expresión del RNAm de TRH: ++p<0.05 y °p<0.01 se refieren a la diferencia vs C. En cuanto a la conducta de ansiedad +p<0.01 se refiere a la diferencia vs C+I, ~p<0.01 se refiere a la diferencia vs AID.

**B)** Contenido de pCREB en N. Acc del grupo C y C+I, determinada por Western Blot; n=2/grupo.

**La dosis alta de inhibidor (2 mg/Kg) disminuye el tiempo de enterramiento en animales control y AID; en animales control este cambio coincide con un aumento en la expresión de TRH en el N. Acc.**

En la serie de diamantes se muestra la conducta de ansiedad, que fue significativamente mayor en el grupo AID respecto al grupo C (545.7  $\pm$  76.1% vs 100  $\pm$  13.3%). Se observó una disminución en la conducta de ansiedad de los animales AID+I respecto al grupo AID (22.9  $\pm$  3.5%, vs 100  $\pm$  37.6%;  $F_{(1,10)} = 6.023$ ; p<0.05). El ANOVA de dos vías mostró efecto de grupos  $F_{(1,17)} = 92.5$ , p<0.0001, de tratamiento  $F_{(1,17)} = 109.8$ , p<0.0001 y una interacción significativa entre ambos factores  $F_{(1,17)} = 74.6$ , p<0.0001.

Se observó un aumento en la expresión de TRH en el N. Acc del grupo C+I respecto al grupo C (141.9  $\pm$  5.7%;  $F_{(3,7)} = 4.871$ ; p<0.05); hubo una tendencia a la alta en los grupos AID y AID+I respecto a C aunque ésta no fue significativa, no se observaron diferencias entre los grupos AID y AID+I (Gráfica 16: A y B).



**Gráfica 16. A)** Expresión del RNAm de TRH en el N. Acc de animales C, C+I, AID y AID+I inyectados con vehículo o con inhibidor 2 mg/Kg i.p. Los animales fueron sacrificados después de someterlos a la prueba de ED. Los valores son la media expresada en porcentaje de diferencia respecto al control (100%)  $\pm$  EEM. RNAm de TRH (n=4/grupo) eje vertical primario o barras, conducta de ansiedad (n=8/grupo) eje vertical secundario o diamantes. ANOVA de una vía estadísticamente significativo contra el grupo C cuando ++p<0.0001, +p<0.001, \*p<0.05 y contra el grupo AID cuando #p<0.0001). **B)** Contenido de pCREB en N. Acc de los grupos C y C+I, determinada por Western Blot; n= 2/grupo.

## **X. DISCUSIÓN.**

En la primera parte del proyecto nos dedicamos a investigar la cinética del efecto del inhibidor de PDE7 (BRL-50481) administrado i.p en animales alimentados *ad libitum*; con pocas referencias en cuanto a su uso *in vivo*, tomamos como referencia la dosis empleada en dichos experimentos y creamos en torno a ella, una curva dosis respuesta en busca de un efecto ansiolítico (evaluado en la prueba de ED) y el aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc. Procedimos a evaluar la duración de dicha respuesta después de la administración del inhibidor y finalmente lo administramos directamente en la corteza del N. Acc, una subdivisión asociada con conductas apetitivas y motivacionales (109, 110), y donde la vía TRHérgica converge con la vía dopaminérgica (112), relacionada también con el despliegue de dichas conductas (113); además, porque la vía TRHérgica del N. Acc parece estar involucrada en la motivación por el consumo de alimento y en estados de ansiedad (66, 112, 139).

### **Curva dosis respuesta y curso temporal.**

Encontramos que la dosis intermedia de inhibidor administrado i.p. (2 mg/Kg) produjo un efecto ansiolítico al administrarla media hora antes de la prueba de ED, este cambio conductual además coincidió con un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el N. Acc que fue significativo con las tres diferentes dosis (Gráficas 1 y 2). Este resultado sugiere la participación del péptido en la conducta de ansiedad, que se ha descrito cuando es administrado i.c.v (66).

Uno de los efectos de la inhibición de PDE7 pudo haber sido la promoción de la actividad de PKA y la consiguiente fosforilación de proteínas blanco como CREB; en este sentido, nuestros resultados preliminares de Western Blot, sugieren un aumento en el contenido de pCREB, mismo que podría estar asociado con la inducción en la expresión del mensajero de TRH en esta región, ya que el promotor del gen de TRH contiene un CRE denominado Sitio 4 (32, 69-71).

En cuanto al efecto ansiolítico observado, cabe señalar que algunos modelos animales de ansiedad como el de aislamiento social muestran un menor contenido de pCREB en la

corteza del N. Acc, que es revertida por el tratamiento con ansiolíticos como el diazepam (140, 141), tratamiento que a su vez normaliza los niveles de pCREB en este núcleo. Además, el aumento en el contenido de pCREB en el N. Acc disminuye la respuesta del animal ante estímulos ansiogénicos mientras que su disminución produce el fenotipo opuesto ante los mismos estímulos (126, 141). Estas evidencias apoyan el papel ansiolítico de pCREB en el N. Acc y también podrían sugerir una asociación entre éste y la expresión de TRH bajo condiciones de ansiólisis (63, 64).

Para evaluar la duración del efecto ansiolítico de 2 mg/Kg i.p, probamos 3 diferentes tiempos entre la administración del fármaco y la prueba de ED: 30 minutos, una hora y 24 horas (Gráficas 3 y 4).

Cascadas de señalización como la del AMPc y aquéllas dependientes de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ , promueven la transcripción de genes específicos alcanzando un máximo alrededor de 30 minutos después de la estimulación y regresando a niveles basales alrededor de 2 a 4 horas después de ésta (142, 143). En el caso de la cascada del AMPc, la temporalidad de sus efectos depende de la subunidad catalítica de PKA, que alcanza niveles máximos entre 15 y 30 minutos después del estímulo, lo cual coincide también con los niveles máximos de fosforilación de CREB y la transcripción de sus genes blanco (78). Estos datos se conocen principalmente de estudios *in vitro*, aunque algunos *in vivo* muestran temporalidades similares y reportan una persistencia del aumento en la concentración de pCREB de hasta 3 horas después del estímulo que indujo su fosforilación (144, 145).

En el caso de TRH, la temporalidad en la expresión de su mensajero se ha evaluado *in vitro* tras la presencia de estímulos que promueven la fosforilación de CREB y corresponde a un intervalo de entre 30 y 60 min (72, 146, 147), lo cual coincide con nuestros resultados.

Cuando la prueba de ED fue realizada 24 después de la administración i.p del inhibidor, también observamos un efecto ansiolítico, sin embargo, éste no estuvo asociado con un aumento en la expresión de TRH en el N. Acc; aunque no descartamos que la inhibición de la PDE7 diera como resultado el aumento de pCREB, el cual está asociado a ansiólisis (126, 140, 141).



### **Administración del inhibidor y de TRH intra N. Acc**

Al igual que en los experimentos anteriores, probamos los efectos de la administración del inhibidor directamente en la corteza del N. Acc, sobre la conducta de ansiedad y la expresión del RNAm de TRH (Gráficas 5 y 6).

La dosis intermedia (4 µg/0.3 µl) pareció tener un efecto ansiolítico respecto al control administrado con vehículo, lo que coexistió con una mayor expresión de TRH tanto en el N. Acc como en NPV.

Por un lado, el aumento en la expresión de TRH en el N. Acc parece estar asociado con la estimulación de la cascada del AMPc y por otro, la mayor expresión de TRH observada en el NPV podría señalar de manera indirecta la comunicación existente entre ambos núcleos (41, 148), aunque aún se desconoce si la naturaleza de tales proyecciones podría ser TRHérgica.

El incremento del RNAm de TRH en el NPV (Gráfica 7) también pudo resultar de la activación de la vía dopaminérgica del N. Acc que inerva al hipotálamo y en particular al NPVa, y que podría incidir sobre la expresión de TRH (41, 111, 149, 150); lo anterior sugeriría que la estimulación de la vía TRHérgica podría participar de manera concertada tanto en la evitación de los alimentos como en la disminución de la ansiedad al vincular a estas dos regiones.

En cuanto a la participación de TRH en el efecto ansiolítico, considerando sus propiedades neuromoduladoras, sería posible que el péptido estuviera interactuando con las vías de señalización glutamatérgica y/o GABAérgica del N. Acc (151). El papel inhibitorio o excitatorio de TRH no se ha esclarecido por completo pero se ha sugerido, con base en evidencias *in vitro* e *in vivo*, que éste podría ser estado dependiente (58).

Cabe señalar que la administración del inhibidor se realizó en la región rostral de la corteza del N. Acc, involucrada en el despliegue de conductas como el ED cuando se administran agonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> o antagonistas de los receptores NMDA/AMPA (68, 152-154), de tal manera que en nuestro experimento, TRH podría haber actuado como excitador en el N. Acc y así participado en la disminución del tiempo de enterramiento.

Un efecto similar pudo haberse dado cuando administramos TRH en la misma subdivisión del N. Acc (Gráfica 8), puesto que observamos también una tendencia a la ansiólisis; estos datos sugieren que, en estos experimentos, TRH podría estar participando en tal efecto como se ha observado al administrarlo de manera central (i.c.v) en roedores (65, 66).

Aunado a lo anterior, la administración del inhibidor de PDE7 directamente en el N. Acc constituye un tipo de estimulación, por lo que el efecto ansiolítico observado podría ser en cierta medida, comparable al del tratamiento por “estimulación cerebral profunda” o DBS en el que los pacientes con trastorno de ansiedad severo y resistente al tratamiento, muestran resultados inmediatos que perduran incluso un año después de la manipulación (128).

### **Evaluación de la conducta alimentaria tras la aplicación del inhibidor de PDE7 en animales control y en un modelo de anorexia.**

Las evidencias que apuntan a que TRH tiene funciones neuromoduladoras son las relacionadas a los efectos que resultan de su administración por diferentes vías y no tanto por la activación de su vía endógena, que es más relevante fisiológicamente (155). En este estudio nos enfocamos en analizar dos conductas en las que se ha implicado a TRH, que son su papel como anorexigénico y como ansiolítico.

Como estrategia para ello utilizamos un acercamiento con el que pretendimos incrementar el contenido intracelular de pCREB, un factor que activa la vía de transcripción de múltiples genes (73), incluido el de TRH (71, 72). Pese a la versatilidad de pCREB, nuestro enfoque consistió en la inhibición de una PDE que se expresa preferencialmente en el N. Acc y NPV, regiones en las que TRH se ha implicado en la regulación de la conducta alimentaria (NPV) y la ansiedad (N. Acc) o ambas (N. Acc), por lo que el incremento en el contenido de pCREB sería resultado de la inhibición de esta PDE en particular y probablemente de una mayor actividad del AMPc y de PKA.

El alto porcentaje de pacientes con AN que también presentan trastornos de ansiedad (102, 103) apoya los esfuerzos para identificar si la vía de síntesis de un péptido anorexigénico y ansiolítico es regulable específicamente en el NPV y en el N. Acc, que son regiones implicadas en el control de estas conductas (2, 30-33). Por lo tanto,

analizamos si el consumo de alimento y la ansiedad de animales control se modificaban de acuerdo a los cambios en la expresión de TRH en las áreas cerebrales a estudiar.

Evaluamos además si la conducta ansiosa de un grupo de animales sometidos a un modelo de anorexia disminuye al activar la vía de TRH en el N. Acc. Por último, exploramos la eficacia del inhibidor de PDE7 para incrementar el contenido de pCREB, la expresión del RNAm de TRH y su participación en el despliegue de las conductas de ansiedad y alimentaria en animales control y con anorexia.

### **Efecto de diferentes dosis de inhibidor de PDE7 sobre la expresión de TRH en N. Acc, NPV y sobre las conductas de ansiedad y alimentaria.**

Con base en estudios previos *in vivo* en los que se utiliza el fármaco BRL-50481, un inhibidor selectivo de PDE7 (89, 90), probamos dos dosis del mismo administradas por vía i.p: 0.2 mg/Kg y 2 mg/Kg; ambas fueron probadas tanto en animales control como en animales sometidos al modelo de AID. Los cambios en la expresión de TRH y en las conductas relacionadas fueron diferenciales dependiendo de la dosis utilizada, del grupo experimental y de la región cerebral analizada.

#### **Controles**

##### *Conducta alimentaria*

La conducta alimentaria de los animales control inyectados (C+I) con 0.2 mg/Kg de inhibidor, disminuyó significativamente respecto a los controles inyectados con vehículo (C) (Gráficas 11 y 12). Esta disminución estuvo asociada a un aumento en la expresión del RNAm de TRH en el NPV, lo que sugiere un efecto anorexigénico del TRH de esta área, como ya se ha descrito (39, 41, 108, 112).

Ambos cambios reprodujeron aquéllos que se presentan en ratas que evitan el alimento al ser sometidas al modelo de AID. Los animales AID tienen mayor expresión de TRH específicamente en las neuronas del NPVa (27), que por sus proyecciones hacia otras regiones del cerebro involucradas en la termorregulación (área preóptica) y en la motivación por el consumo de alimento (ATV), podrían estar promoviendo la conducta de anorexia y con ella, la pérdida de peso en los animales sometidos al modelo (8, 156).

Es más factible que el aumento en el RNAm de TRH del NPV tras la inhibición de la PDE7, se deba a la activación de neuronas TRHérgicas del NPVa que a la de aquéllas con función neuroendócrina, ya que la transcripción del gen de TRH en estas últimas está bajo la regulación del receptor a hormonas tiroideas más que por pCREB. En cambio las células que expresan TRH y que se han implicado en la conducta alimentaria sí pueden responder al incremento en el contenido de pCREB (72, 157-160).

La administración del inhibidor aplicada en nuestros experimentos fue aguda, sin embargo, es posible que su administración continua en animales control, durante el mismo tiempo de duración del modelo de AID (5 días) acentuara la disminución en el consumo de alimento.

No descartamos la posibilidad de que la estimulación de la vía del AMPc podría haber afectado la expresión de otros péptidos que participan en la regulación de la conducta alimentaria tales como CART o POMC (161, 162), sin embargo, dichas posibilidades se reducen por la selectividad del inhibidor (88), por la particular localización de PDE7B en el cerebro (87) y por su colocalización con TRH en las neuronas del N. Acc y el NPV (resultados de nuestro laboratorio no publicados).

Por otro lado, la dosis de 2mg/Kg careció de efecto sobre el consumo de alimento en los animales control y sobre la expresión de TRH del NPV (Gráfica 13), con lo que la asociación entre ambos parámetros se mantuvo. Si bien se sabe poco sobre la farmacodinamia y farmacocinética de este inhibidor, algunos inhibidores de otras PDEs muestran un comportamiento similar al de una “U” invertida perdiendo efecto sobre un parámetro determinado a dosis entre 10 y 100 veces mayores respecto a la dosis más baja empleada o bien, modifican parámetros diferentes en una vía o circuito dependiendo de la dosis utilizada (163, 164).

Otra explicación posible es el aumento en la expresión de la D2 en el hipotálamo mediobasal debido a la inhibición de PDE7 (Gráfica 14), ya que el gen de D2 tiene un elemento de respuesta para pCREB (25). La activación de esta enzima provoca la desyodación de T<sub>4</sub> aumentando el contenido hipotalámico de T<sub>3</sub>, que es capaz de inhibir la expresión de TRH en animales control ayunados (165).

Como consecuencia de lo anterior, la probable disminución en la expresión del péptido en neuronas hipofisiotrópicas, pudo interferir y diluir el aumento del contenido de RNAm de

TRH de las neuronas del NPVa; esto porque la disección sobre la cual se analizó la expresión del RNAm de TRH contenía a todo el NPV. Para apoyar esta hipótesis evaluamos la expresión de D2 en animales inyectados con inhibidor y encontramos un aumento con respecto al grupo inyectado con vehículo.

El aumento en la expresión de TRH asociado a la inyección del inhibidor de PDE7 resultó región-específico y dosis-dependiente. En animales C+I, la dosis baja (0.2 mg/Kg) provocó un aumento en la síntesis de TRH sólo en el NPV, y la más alta sólo en el N. Acc. Sin embargo, la reducción de la conducta alimentaria estuvo asociada al incremento en contenido de RNAm de TRH sólo cuando este se observó en el NPV.

El hecho de que el grupo C+I (dosis 2 mg/Kg) (Gráfica 13) no disminuyera su consumo de alimento a pesar del incremento en la expresión de TRH del N. Acc (Gráfica 16), no necesariamente descarta a la vía TRHérgica de esa región en la regulación de la conducta alimentaria, ya que la inyección del péptido directamente sobre el N. Acc reduce el consumo en ratas sólo cuando se les realimenta tras un ayuno de 48 h (139); en cambio, cuando se mantienen con una alimentación *ad libitum*, el péptido no parece tener efecto. Este resultado coincide con las acciones estado-dependientes que se le atribuyen a TRH (8, 58), esto es, sólo inhibiría la conducta alimentaria cuando están activados los mecanismos que la estimulan.

Cabe señalar además, que las neuronas que sintetizan TRH en el N. Acc, proyectan hacia regiones implicadas en otras funciones, mientras que los receptores TRH-R1 que se expresan en el N. Acc al ser estimulados por TRH exógeno sí parecen ser los responsables de la inhibición de la ingesta en estos animales.

#### *Conducta de ansiedad*

El grupo C+I inyectado con la dosis baja del inhibidor (0.2 mg/Kg) (Gráfica 15) no presentó cambio en su conducta de ansiedad al ser evaluada en el modelo de ED en comparación con el grupo C. En cambio con la dosis de 2 mg/Kg (Gráfica 16) sí observamos una disminución significativa en la conducta de ansiedad de los animales.

Recordando la selectividad de su inhibidor y la expresión de la PDE7B en el N. Acc, el efecto ansiolítico observado pudo deberse a un aumento en el contenido de AMPc en dicha región, que se ha catalogado en estudios relativamente recientes como un sustrato

neuronal que responde y afecta el despliegue de la conducta de ansiedad en la prueba de ED (68, 153).

Algunos modelos animales de ansiedad muestran que durante este estado, existe un menor contenido de pCREB en la corteza del N. Acc, mismo que es revertido por el tratamiento con fármacos que incrementan la actividad de pCREB en dicha región (76, 77, 97); es posible que en nuestros experimentos hayamos provocado un efecto similar al estimular la vía del AMPc mediante la inhibición de PDE7B y como resultado, se haya inducido un efecto ansiolítico. Todo lo anterior, aunado a que por sí mismo, el aumento en el contenido de pCREB en el N. Acc, sugerido por nuestros resultados preliminares utilizando la técnica de Western Blot, está asociado a un estado de ansiólisis (126, 140, 141).

Dicho aumento en el contenido de pCREB en el N. Acc podría también estar relacionado con el aumento en la expresión de TRH en la misma región pero sólo con la dosis de 2 mg/Kg de inhibidor. Recordemos que TRH tiene conocidas funciones como neuromodulador, entre las que se encuentra la de participar en ansiólisis cuando se administra por vía i.c.v (66) o bien, directamente en el N. Acc (sugerido por nuestros resultados).

El aumento observado en la expresión de TRH señala un aumento en la síntesis del péptido, esta posibilidad no solo propone al N. Acc como sustrato de la síntesis de TRH en condiciones de ansiólisis sino que también sugiere que el TRH sintetizado en este núcleo podría estar provocando tal efecto, posiblemente al actuar como neuromodulador en otras regiones del cerebro, por ejemplo en la amígdala, con la que el N. Acc comparte proyecciones y que constituye un punto crítico en la integración del valor afectivo o emocional de un estímulo y la concreción de una respuesta conductual ante éste (105, 111).

En conjunto, los resultados respecto a ambas conductas (anorexia y ansiedad) sugieren que en animales control, la inhibición de PDE7B con una dosis de 0.2mg/Kg i.p, es suficiente para reproducir una mayor expresión de TRH en el NPV y menor consumo de alimento, similar a lo que se observa en animales con anorexia. Sin embargo, se requiere una dosis 10 veces mayor para lograr un aumento en la expresión de TRH en el N. Acc, misma que coexiste con un estado de ansiólisis.

Estas evidencias apuntarían entonces a que las vías por las cuales TRH modula la conducta alimentaria y la de ansiedad en el NPV y en el N. Acc respectivamente, responden diferente ante un mismo estímulo, específicamente: que probablemente la vía TRHérgica del NPV sea más susceptible que la del N. Acc ante la inhibición de la PDE7B. Por lo tanto, al menos por medio de este mecanismo, no es posible observar simultáneamente los efectos ansiolítico y anorexigénico sugeridos para TRH.

### **Modelo de AID.**

#### *Conducta alimentaria.*

El grupo con anorexia e inyección de vehículo (AID) presentó la reducción en el consumo de alimento a cerca del 10% de lo que consumen los controles, como se había descrito previamente (Gráficas 9 y 10) (38, 39, 108, 112). Además, se observó en este grupo la expresión incrementada de TRH esperada tanto en el NPV (27, 39) como en el N. Acc (108, 112).

El aumento en la expresión de TRH en el NPV está bien documentado en el contexto de este modelo y constituye una respuesta aberrante ante el déficit de las reservas energéticas de estos animales, que pierden peso de manera importante. Este aumento es consistente con el efecto anorexigénico de TRH cuando se administra i.c.v (34-37). Además, el aumento en la expresión del péptido se observa en las neuronas TRHérgicas no hipofisiotrópicas del NPV involucradas en aspectos motivacionales del consumo de alimento, razones por las que se esperaría que un animal en balance negativo de energía tuviera una menor expresión del péptido, como sucede durante la restricción alimentaria (166).

En cambio, el consumo de alimento durante el periodo posterior a la administración del inhibidor al grupo con anorexia, no tuvo cambio con ninguna dosis y tampoco se encontraron diferencias en la expresión de TRH en el NPV entre los grupos con AID y AID+I, pero la tendencia al incremento se mantuvo respecto al control.

La ausencia de cambios en la expresión de TRH hipotalámico tras inhibir a PDE7B podría deberse a que ésta ha alcanzado un máximo o “techo” y que a pesar del probable aumento del inductor de su transcripción (pCREB), la expresión del péptido no alcance niveles aún mayores que los propios del modelo. Además, este resultado puede significar

que CREB está involucrado en el incremento característico de TRH en animales AID y que por ello no vemos un efecto aditivo tras la inyección del inhibidor en el grupo AID+I. Esta falta de aumento del RNAm de TRH ya se ha observado en animales con anorexia sometidos al frío versus animales control sometidos al mismo estímulo, en los que se esperaría que la expresión de TRH aumentara para promover la termogénesis (39).

Estos resultados sugieren que: la expresión de TRH tiene una relación inversa con el consumo de alimento en animales C y AID. El aumento propuesto de pCREB también parece tener una relación inversa con la conducta alimentaria, como está documentado (161, 162).

#### *Conducta de ansiedad.*

En la prueba de ED corroboramos que los animales sometidos al modelo de AID se encuentran significativamente más ansiosos que los controles (39), lo cual observamos como un mayor tiempo de congelamiento, uno de los dos parámetros de esta prueba para evaluar los niveles de ansiedad (Gráfica 15 y 16) (67).

Reprodujimos también, el aumento en la expresión de TRH en el N. Acc comparado con el de los controles que además coexiste con una disminución en el contenido del péptido maduro en esta región (108, 112), sugiriendo que está siendo liberado hacia otras áreas, tal vez como mecanismo compensatorio al carácter ansiogénico del balance negativo de energía.

TRH parece tener propiedades excitatorias e inhibitorias en diferentes paradigmas, por lo que se ha sugerido que sus efectos son estado-dependientes (8, 58), sin embargo, en el modelo de AID es posible que una desregulación similar a la que mantiene la conducta de anorexia, impida que TRH actúe como ansiolítico en este grupo.

La administración del inhibidor de PDE7 no produjo mayor incremento en la expresión de TRH en el N. Acc a ninguna dosis, lo que (como mencionamos antes) pudiera sugerir que CREB mismo estuvo involucrado en la mayor expresión del RNAm de TRH en el grupo de AID, y que por ello un mayor contenido de pCREB no tuvo un efecto superior.

Sí observamos reducción de la conducta de ansiedad en el grupo A+I con ambas dosis de inhibidor, lo cual apoya la participación de la cascada del AMPc en ansiólisis (126, 140,



141) y sugiere que probablemente no sea TRH del N. Acc quien esté causando este efecto en el grupo de anorexia.

En resumen, la inhibición de PDE7 sí parece relacionarse con ansiólisis y con aumento en la expresión de TRH únicamente en animales control; además, la ansiedad del grupo AID parece ser independiente de TRH.

## **XI. CONCLUSIONES.**

Las diferencias conductuales y de la expresión de TRH tanto en el NPV como el N. Acc en respuesta a la inhibición de la PDE7 señalan que la vía TRHérgica en estas regiones se modula de manera independiente ante la estimulación de la actividad de la vía del AMPc, y sugieren que existen diferencias en cuanto a la susceptibilidad de una y otra ante la actividad de esta cascada de señalización.

Los resultados obtenidos también se suman a la evidencia en torno a la participación del N. Acc en la integración del componente afectivo de un estímulo y la respuesta conductual ante éste, de manera particular en cuanto a un estímulo ansiogénico como el balance negativo de energía y la exposición a la prueba de ED, y sugieren a la vía TRHérgica de esta región, como un mecanismo asociado con dicha integración.

En cuanto al consumo de alimento, reforzamos la asociación entre la expresión de TRH en el NPV y el despliegue de la conducta de anorexia y comprobamos que ésta es reproducible mediante la estimulación de la expresión de TRH por la inhibición de PDE7.

Considerando nuestros resultados, el inhibidor de PDE que empleamos parece estar asociado con efectos ansiolíticos y/o anorexigénicos; si bien se requieren estudios más profundos sobre los mecanismos que llevan a estos efectos conductuales, este fármaco podría tener potencial en el tratamiento de la ansiedad.

Nuestros datos también evidencian la complejidad de la relación entre la conducta de ansiedad y la alimentaria, y apuntan a la implicación de otras vías neuronales y cascadas de señalización en dichas relaciones, por lo que el estudio de estas conductas y del entramado neurológico que las origina, requiere de mayor estudio.

## XII. REFERENCIAS.

1. Williams G, Harrold JA, Cutler DJ. The hypothalamus and the regulation of energy homeostasis: lifting the lid on a black box. *Proc Nutr Soc.* 2000;59(3):385-96.
2. Leibowitz SF, Wortley KEI. Hypothalamic control of energy balance: different peptides, different functions. *Peptides.* 2004;25:473–504.
3. Valassi E, Scacchi M, Cavagnin F. Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.* 2008;18:158-168.
4. Guillemin R. Hypothalamic hormones a.k.a hypothalamic releasing factors. *J Endocrinol.* 2005;184(1):11-28.
5. Nillni EA, Friedman TC, Todd RB, Birch NP, Loh YP, Jackson IM. Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *J Neurochem.* 1995;65(6):2462-72.
6. Mariotti S. Physiology of the Hypothalamic-Pituitary Thyroidal System (imagen). Citado Sept 2014. Disponible en: <http://www.thyroidmanager.org/chapter/physiology-of-the-hypothalamic-pituitary-thyroidal-system/>
7. Nillni EA, Sevarino KA. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr Rev.* 1999;20(5):599-648.
8. Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sciences.* 1998;62:1443-1448.
9. Lechan RM. Update on thyrotropin-releasing hormone. *Thyroid Today.* 1993;16:1–12.
10. Lechan RM, Jackson IM. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology.* 1982;111:55–65.
11. Sun Y, Lu X, Gershengorn MC. Thyrotropin-releasing hormone receptors – similarities and differences. *J Mol Endocrinol.* 2003;30:87–97.
12. Hsieh KP, Martin TF. Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Mol Endocrinol.* 1992;6:1673–1681.

13. Kiley SC, Parker PJ, Fabbro D, Jaken. Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *J Biol Chem.* 1991;266:23761–23768.
14. Jefferson AB, Travis SM, Schulman H. Activation of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase in GH3 cells. *J Biol Chem.* 1991;266:1484–1490.
15. Kanda Y, Koike K, Ohmichi M, Sawada T, Hirota K, Miyake A. A possible involvement of tyrosine kinase in TRH-induced prolactin secretion in GH3 cells. *Biochem Biophysical Res Commun.* 1994;199: 1447–1452.
16. Ohmichi M, Sawada T, Kanda Y, Koike K, Hirota K, Miyake A, Saltiel AR. Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1994;269:3783–3788.
17. Gershengorn MC, Osman R. Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev.* 1996;76:175–191.
18. Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K, Suzuki M. Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology.*1988;47:384–388.
19. Danforth E, Burger A. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *Clin Endocrinol Metab.* 1984;13:581-95.
20. Onur S, Haas V, Bosy-Westphal A, Hauer M, Paul T, Nutzinger D, Klein H, Muller MJ. L-tri-iodothyronine is a major determinant of resting energy expenditure in underweight patients with anorexia nervosa and during weight gain. *Eur J Endocrinol.* 2005;152:179-84.
21. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 1987;238:78–80.
22. Koller KJ, Wolff RS, Warden MK, Zoeller RT. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus (in situ hybridization/negative feedback/triiodothyronine/neuropeptides/rat brain). *Proc Nati Acad Sci.* 1987;84:7329-7333.

23. Schroeder AC, Privalsky ML. Thyroid hormones, T3 and T4, in the brain. *Front Endocrinol.* 2014. DOI: 10.3389/fendo.2014.00040.
24. Brent GA. The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med.* 1994;29(331):847-53.
25. Fekete C, Lechan RM. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Front Neuroendocrinol.* 2007;28(2-3): 97–114.
26. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, Bartha T, Legradi G, Larsen PR, Lechan RM. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology.* 1997;138:3359–3368.
27. Álvarez-Salas E, Aceves C, Anguiano B, Uribe RM, García-Luna C, Sánchez E, de Gortari P. Food-Restricted and Dehydrated-Induced Anorexic Rats Present Differential TRH Expression in Anterior and Caudal PVN. Role of Type 2 Deiodinase and Pyroglutamyl Aminopeptidase II. *Endocrinology.* 2012;153: 4067–4076.
28. Nishiyama T, Kawano H, Tsuruo Y, Maegawa M, Hisano S, Adachi T, et al. Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing neurons involved in the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. Light microscopic immunohistochemistry. *Brain Res.* 1985;345(2):205-18.
29. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 1987;238(4823):78-80. DOI: 10.1126/science.3116669.
30. Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q. Association of cocaine-and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci.* 2000;24:9224-9234.
31. Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 1997;138:2569-2576.

32. Harris M, Aschkenasi C, Elias CF, Chandrankunnel A, Nilni EA, Bjorbaek C, et al. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *J Clin Invest.* 2001;107:111-120.
33. Sarkar S, Lechan RM. Central administration of neuropeptide Y reduces alpha-melanocyte-stimulating hormone-induced cyclic adenosine 5'-monophosphate response element binding protein (CREB) phosphorylation in pro-thyrotropin-releasing hormone neurons and increases CREB phosphorylation in corticotrophin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology.* 2003;144:281-291.
34. Vogel RA, et al. Effects of thyrotropin-releasing hormone on locomotor activity, operant performance and ingestive behavior. *J Pharmacol Exp Ther.* 1979;208:161-168.
35. Morley JE, Levine AS. Thyrotropin releasing hormone (TRH) suppresses stress induced eating. *Life Sci.* 1980;21(27):269-274.
36. Choi YH, Hartzell D, Azain MJ, Baile CA. TRH decreases food intake and increases water intake and body temperature in rats. *Physiol Behav.* 2002;77:1-4.
37. Gotoh K, Fukagawa K, Fukagawa T, Noguchi H, Kakuma T, Sakata T, Yoshimatsu H. Hypothalamic neuronal histamine mediates thyrotropin-releasing hormone-induced suppression of food intake. *J Neurochem.* 2007;103:1102-10.
38. Watts AG, Sánchez-Watts G, Kelly AB. Distinct patterns of neuropeptide gene expression in the lateral hypothalamic area and arcuate nucleus are associated with dehydration induced anorexia. *J Neurosci.* 1999;19(14):6111-6121.
39. Jaimes-Hoy Joseph-Bravo P, de Gortari P. Differential adaptations of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav.* 2008;53(2):366-377.
40. Boutin A, Allen MD, Neumann S, Gershengorn MC. Persistent signaling by thyrotropin-releasing hormone receptors correlates with G-protein and receptor levels. *FASEB J.* 2012;26:3473-3482.
41. Wittmann G, Füzesi T, Singru PS, Liposits Z, Lechan RM, Fekete C. Efferent projections of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons residing in the anterior

parvocellular subdivision of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol.* 2009;515:313–330.

42. Tuomisto J, Ranta T, Mannisto P, Saarinen A, Leppaluoto J. Neurotransmitter control of thyrotropin secretion in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1975;30:221-229.

43. Grimm Y, Reichlin S. Thyrotropin releasing hormone (TRH): neurotransmitter regulation of secretion by mouse hypothalamic tissue in vitro. *Endocrinology.* 1973;93(3):626–631.

44. Kasparov S, Pawelzik, H, Zieglgänsberger W. Thyrotropin-releasing hormone enhances excitatory postsynaptic potentials in neocortical neurons of the rat in vitro. *Brain Res.* 1994;656:229-235.

45. Nie Y, Schoepp DD, Klaunig JE, Yard M, Lahiri DK, Kubek MJ. Thyrotropin-releasing hormone (protirelin) inhibits potassium-stimulated glutamate and aspartate release from hippocampal slices in vitro. *Brain Res.* 2005;1054(1):45-54.

46. Stocca G, Nistri A. Modulation by TRH of NMDA-elicited responses of CA1 neurons of the rat hippocampal slice preparation. *Neurosci Lett.* 1994;166(2):139-142.

47. Breese GR, Frye GD, McCown TJ, Mueller RA. Comparison of the CNS effects induced by TRH and bicuculine after microinjection in the medial septum, substantia nigra and inferior colliculus: absence of support for a GABA antagonist action for TRH. *1984;21(1):145-149.*

48. Horita A, Carino MA, Chesnut RM. Influence of thyrotropin releasing hormone (TRH) on drug-induced narcosis and hypothermia in rabbits. *Psychopharmacology (Berl).* 1976;49(1):57-62.

49. Carino MA, Smith JR, Weick BG, Horita A. Effects of thyrotropin-releasing hormone (TRH) microinjected into various brain areas of conscious and pentobarbital-pretreated rabbits. *Life Sci.* 1976;19:1687-1692.

50. Yarbrough GG. Studies on the neuropharmacology of thyrotropin releasing hormone (TRH) and a new TRH analog. *Eur J Pharmacol.* 1979;48(1):19-27.

51. Loscher W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure.* 2011;20:359-368.

52. de Gortari P, Fernández-Guardiola A, Martínez A, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res.* 1995;679(1):144-50.
53. de Gortari P, Uribe RM, García-Vázquez A, Aguilar-Valles A, Martínez A, Valdés A, et al. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem Int.* 2006;48(1):31-42.
54. Kubek MJ, Garg BP. Thyrotropin-releasing hormone in the treatment of intractable epilepsy. *Pediatr Neurol.* 2002;26(1):9-17.
55. Sattin A. The role of TRH and related peptides in the mechanism of action of ECT. *J ECT.* 1999;15:76–92.
56. Post RM, Weiss SR. A speculative model of affective illness cyclicity based on patterns of drug tolerance observed in amygdala-kindled seizures. *Mol Neurobiol.* 1996;13:33–60.
57. Plotnikoff NP, Prange AJ Jr, Breese GR, Anderson MS, Wilson IC. Thyrotropin releasing hormone: enhancement of DOPA activity by a hypothalamic hormone. *Science* 1972;178:417–418.
58. Gary KA, Sevarino KA, Yarbrough GC, Prange AJ Jr, Winokour A. The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;305:410-416.
59. Kirkegaard C, Faber J. The role of thyroid hormones in depression. *Eur J Endocrinol.* 1998;138(1):1-9.
60. Mayberg HS. Modulating dysfunctional limbic-cortical circuits in depression: towards development of brain-based algorithms for diagnosis and optimized treatment. *Br Med Bull.* 2003;65:193-207.
61. Reny-Palasse V, Rips R. Potentiation by TRH of the effect of imipramine on the forced-swimming test. *Br J Pharmacol.* 1985;85:463-470.
62. Reny-Palasse V, Constans M, Rips R. Potentiation by TRH of the effect of antidepressants in the forced-swimming test, involvement of dopaminergic and opioid systems. *Br J Pharmacol.* 1989;97:197-205.

63. Pekary AE, Sattin A, Meyerhoff JL, Chilingar M. Valproate modulates TRH receptor, TRH and TRH-like peptide levels in rat brain. *Peptides*. 2004;25(4):647-658.
64. Sattin A, Senanayake SS, Pekary AE. Lithium modulates expression of TRH receptors and TRH-related peptides in rat brain. *Neuroscience*. 2002;115(1):263-273.
65. Thompson BL, Rosen JB. Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides*. 2000;34(1):38-44.
66. Gutiérrez-Mariscal M, de Gortari P, López-Rubalcava C, Martínez A, Joseph-Bravo P. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33:198-213.
67. De Boer SF, Koolhaas JM. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *European Journal of Pharmacology*. 2003;463:145-161.
68. Reynolds SM, Berridge KC. Fear and feeding in the nucleus accumbens shell: rostrocaudal segregation of GABA-elicited defensive behavior versus eating behavior. *J Neurosci*. 2001;21(9):3261-3270.
69. Lee SL, Stewart K, Goodman RH. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem*. 1988;263(32):16604-9.
70. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest*. 2001;107:1017-1023.
71. Balkan W, Taviani MA, Gkonos PJ, Roos BA. Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology*. 1998;139(1):252-259.
72. Cote-Vélez A, Pérez-Martínez L, Díaz-Gallardo MY, Pérez-Monter C, Carreón-Rodríguez A, Carreón-Rodríguez AC, et al. Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005;34:177-197.
73. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 2002;35:605-623.



74. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(8):599-609
75. Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S. CREB and memory. *Annu Rev Neurosci.* 1998;21:127-148.
76. Dash PK, Karl KA, Colicos MA, Prywes R, Kandel ER. cAMP response element-binding protein is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin as well as cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88:5061-65.
77. Bacsikai BJ, Hochner B, Mahaut-Smith M, Adams SR, Kaang BK, Kandel ER, et al. Spatially resolved dynamics of cAMP and protein kinase A subunits in *Aplysia* sensory neurons. *Science.* 1993;260:222-26.
78. Hagiwara M, Brindle P, Harootunian A, Armstrong R, Rivier J, Vale W, et al. Coupling of hormonal stimulation and transcription via the cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4852-59.
79. Cisbio Assays. Phospho-CREB (Ser133) Cellular Assay Kit. Citado Sept 2014. Disponible en: <http://www.htf.com/usa/phospho-creb-ser133-cellular-assay-kit>
80. Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Kempf CR, Long J, Laidler P, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *AGING,* 2011;3(3):192-222.
81. Nikolaev VO, Lohse MJ. Monitoring of cAMP Synthesis and Degradation in Living Cells. *Physiology.* 2006;21(2):86-92
82. Mansuy I. A constraint on cAMP signaling. *Neuron.* 2004;41(1):4-6.
83. Bender AT, Beavo J. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews.* 2006;58(3):488-520.
84. Greco EA, Spera G, Aversa A. Combining Testosterone and PDE5 Inhibitors in Erectile Dysfunction: Basic Rationale and Clinical Evidences. *Eur Urol.* 2006;50:940–947.
85. Fujita M, Hines CS, Zoghbi SS, Mallinger AG, Dickstein LP, Liow JS, Zhang Y, Pike VW, Drevets WC, Innis RB, Zarate CA Jr. Downregulation of brain phosphodiesterase type

IV measured with <sup>11</sup>C-(R)-rolipram positron emission tomography in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2012;72(7):548-54

86. Smith SJ, Cieslinski LB, Newton R, Donnelly LE, Fenwick PS, Nicholson AG, et al. Discovery of BRL-50481 [3-(N, N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Mol Pharmacol*. 2004;66(6):1679-1689.

87. Reyes-Irisarri E, Pérez-Torres S, Mengod G. Neuronal expression of cAMP-specific phosphodiesterase 7B mRNA in the rat brain. *Neuroscience*. 2005;132(4):1173-85.

88. Gil C, Campillo NE, Pérez DI, Martínez A. PDE7B inhibitors as new drugs for neurological and inflammatory disorders. *Expert Opin Ther Patents*. 2008;18(10):1127-1139.

89. Nandhakumar J, Ernest V, Tyagi MG. Evaluation of seizure activity after phosphodiesterase inhibition (BRL-50481) with guanylate cyclase activation (A-350619) and inhibition (methylene blue) in animal models of epilepsy. *J Neurol Neurophysiol*. 2011;2(1):1-6.

90. Nandhakumar J, Selvamurugan M, Tyagi MG. Investigation of seizure activity after cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibition with second messenger and calcium ion channel inhibition in mice. *IJABPT*. 2012;3(1):297-308.

91. Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DGA, Seal LJ, Kong WM, et al. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest*. 2000;105:1005-1011.

92. Fekete C, Sarkar S, Rand WM, Harney JW, Emerson CH, Bianco AC, et al. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AgRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology*. 2002;143:3846-3853.

93. Rondeel JM, Heide R, de Greef WJ, van Toor H, van Haasteren GA, Klootwijk W, et al. Effect of starvation and subsequent refeeding on thyroid function and release of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology*. 1992;56:348-353.

94. van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, et al. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol.* 1995;145:143–153.
95. Leslie RD, Isaacs AJ, Gomez J, Raggatt PR, Bayliss R. Hypothalamo-pituitary-thyroid function in anorexia nervosa: influence of weight gain. *British Medical Journal.* 1978;2:526-528.
96. Bailer UF, Kaye WH. A Review of Neuropeptide and Neuroendocrine Dysregulation in Anorexia and Bulimia Nervosa. *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders.* 2003;2:53-59 53.
97. Kaye WH. Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa purdue ingestive behavior research center symposium influences on eating and body weight over the lifespan: children and adolescents. *Physiol Behav.* 2008;94(1):121-135.
98. Stoving RK, Hangaard J, Hagen CI. Update on endocrine disturbances in anorexia nervosa. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001;14(5):459-480.
99. Herpertz S, Albers N, Wagner R, Pelz B, Kopp W, Mann K, et al. Longitudinal changes of circadian leptin, insulin and cortisol plasma levels and their correlation during refeeding in patients with anorexia nervosa. *European Journal of Endocrinology.* 2000;142:373-379.
100. Heski-Rahkonen A, Raevuori A, Hoek H. Epidemiology of eating disorder: an update. *Annual Review of Eating Disorders Part 2.* 2008;58-68.
101. Vardar E, Erzen M. The prevalence of eating disorders (ED) and comorbid psychiatric disorders in adolescents: a two-stage community-based study. *Turkish Journal of Psychiatry.* 2011;1-7.
102. Godart NT, Flament MF, Lecrubier Y, Jeammet PI. Anxiety disorders in anorexia nervosa and bulimia nervosa: co-morbidity and chronology of appearance. *Eur Psychiatry.* 2000;15(1):38-45.
103. Kaye WH, Bulik CM, Thornton L, Barbarich N, Masters K. Comorbidity of anxiety disorders with anorexia and bulimia nervosa. *Am J Psychiatry.* 2004; 161:2215-2221.

104. Connan F, Lightman SL, Landau S, Wheeler M, Treasure J, Campbell IC. An investigation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hyperactivity in anorexia nervosa: The role of CRH and AVP. *J Psychiatr Res.* 2007;41:131-143.
105. Avena NM, Bocarsly ME. Dysregulation of Brain Reward Systems in Eating Disorders: Neurochemical Information from Animal Models of Binge Eating, Bulimia Nervosa, and Anorexia Nervosa. *Neuropharmacology.* 2012;63(1):87-96.
106. Barbarich NC, Kaye WH, Jimerson D. Neurotransmitter and imaging studies in anorexia nervosa: new targets for treatment. *Current Drug Targets-CNS & neurological disorders.* 2003;2(1):61-72.
107. Sodersten P, Bergh C, Ammar A. Anorexia nervosa: towards a neurobiologically based therapy. *Eur J Pharmacol.* 2003;480:67-74.
108. Jaimes-Hoy L. Metabolismo de la hormona liberadora de tirotropina en modelos animales de anorexia y restricción alimentaria en regiones del sistema límbico. Tesis de licenciatura. Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE; 2003.
109. Salamone JD, Correa M, Mingote S, Weber SM. Nucleus accumbens dopamine and the regulation of effort in food-seeking behavior: implications for studies of natural motivation, psychiatry, and drug abuse. *JPET.* 2002;305(1):1-8.
110. Zahm DS. Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;29;877:113-28.
111. Shirayama Y, Chaki S. Neurochemistry of the nucleus accumbens and its relevance to depression and antidepressant action in rodents. *Current Neuropharmacology.* 2006;4:277-291.
112. Jaimes-Hoy L. Efecto de la anorexia por deshidratación en la expresión de los genes de TRH, CRH y sus receptores en el sistema límbico de la rata. Tesis de maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM; 2009.
113. Salamone JD, Correa M, Mingote SM, Weber SM. Beyond the reward hypothesis: alternative functions of nucleus accumbens dopamine. *Curr Opin Pharmacol.* 2005;5:34-41.

114. Green AR, Heal DJ. Release of dopamine in the nucleus accumbens of rats by thyrotropin releasing hormone (TRH). *Proceedings of the B.P.S.* 1978;385P-386P.
115. Narumi S, Nagai Y, Saji Y, Nagawa Y. A possible mechanism of action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its analog DN-1417 on the release of dopamine from the nucleus accumbens and striatum in rats. *Japan J Pharmacol.* 1985;39:425-435.
116. Funk D, Post RM, Pert A. Role of central dopaminergic and 5-hydroxytryptaminergic projections in the behavioral responses elicited by thyrotropin-releasing hormone in rats. *Psychopharmacology (Berl).* 1997;133(4):356-362.
117. Kerwin RW, Pycock CJ. Thyrotropin-releasing hormone stimulates release of [3H]-dopamine from slices of rat nucleus accumbens in vitro. *Br J Pharmac.* 1979;67:323-325.
118. Di Chiara G. Nucleus accumbens shell and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behav Brain Res.* 2002;137:75-114.
119. Salamone JD, Correa M, Farrar A, Mingote SM. Effort-related functions of nucleus accumbens dopamine and associated forebrain circuits. *Psychopharmacology.* 2007;191:461-482.
120. Wang J, Chang C, Geng N, Wang X, Gao G. Treatment of intractable anorexia nervosa with inactivation of the nucleus accumbens using stereotactic surgery. *Stereotact Funct Neurosurg.* 2013;91(6):364-72.
121. Shin LM, Liberzon I. The neurocircuitry of fear, stress, and anxiety disorders. *Neuropsychopharmacology Reviews.* 2010;35:169-191.
122. Barrot M, Marinelli M, Abrous DN, Rougé-Pont F, Le Moal M, Piazza PV. The dopaminergic hyper-responsiveness of the shell of the nucleus accumbens is hormone dependent. *Eur J Neurosci.* 2000;12:973-979.
123. Peciña S, Schulkin J, Berridge KC. Nucleus accumbens corticotrophin-releasing factor increases cue-triggered motivation for sucrose reward: paradoxical positive incentive effects in stress? *BMC Biology.* 2006;4(8):1-16.
124. Pliakas AM, Carlson RR, Neve RL, Konradi C, Nestler EJ, Carlezon WA Jr. Altered responsiveness to cocaine and increased immobility in the forced swim test associated

with elevated cAMP response element-binding protein expression in nucleus accumbens. *J Neurosci*. 2001;21(18):7397-7403.

125. Jones DC, Kuhar MJ. Cocaine-amphetamine-regulated transcript expression in the rat nucleus accumbens is regulated by adenylyl cyclase and the cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A second messenger system. *JPET*. 2006;317(1):454-461.

126. Barrot M, Olivier JD, DiLeone RJ, Berton O, Eisch AJ, Impey S, et al. CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *PNAS*. 2002;99(17):11435-11440.

127. Sturm V, Lenartz D, Koulousakis A, Treuer H, Herholz K, Klein JC, et al. The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive compulsive and anxiety disorders. *J Chem Neuroanat*. 2003;26(4):293-299.

128. Bewernick BH, Hurlmann R, Marusch, Kayser S, Grubert C, Hadrysiewicz B, et al. Nucleus accumbens deep brain stimulation decreases ratings of depression and anxiety in treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry*. 2010;67:110-116.

129. Jackson ME, Moghaddam B. Amygdala regulation of nucleus accumbens dopamine output is governed by the prefrontal cortex. *J Neurosci*. 2001;21(2):676-681.

130. Cardinal RN, Parkinson JA, Hall J, Everitt BJ. Emotion and motivation: the role of the amygdala, ventral striatum, and prefrontal cortex. *Neurosci Biobehav Rev*. 2002;26:321-352.

131. van Son GE, van HD, Bartelds AI, van Furth EF, Hoek HW. Time trends in the incidence of eating disorders: a primary care study in the Netherlands. *Int J Eat Disord*. 2006;39:565-9.

132. Currin L, Schmidt U, Treasure J, Jick H. Time trends in eating disorder incidence. *Br J Psychiatry*. 2005 Feb;186:132-5.

133. Isomaa R, Isomaa AL, Marttunen M, Kaltiala-Heino R, Bjorkqvist K. The prevalence, incidence and development of eating disorders in Finnish adolescents: a two-step 3-year follow-up study. *Eur Eat Disord Rev*. 2009;17:199-207.

134. Treit D, JPJ Pinel, Fibiger HC. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav*. 1981;15(4):619-626.

135. De Boer SF, Koolhaas JM. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur J Pharmacol.* 2003;463:145-161.
136. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 5th ed. USA: Elsevier; 2005.
137. Zeng H, Schimpf BA, Rohde AD, Pavlova MN, Gragerov A, Bergmann JE. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice display increased depression and anxiety-like behavior. *Mol Endocrinol.* 2007;21(11):2795-2804.
138. Lowry OH, Rosebrough NJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Bio Chem.* 1951;193:265-275.
139. Puga Valdés L. Efecto de la inyección intra-núcleo accumbens de TRH sobre el metabolismo de dopamina en el sistema límbico y en la conducta alimentaria y motivación por el consumo en ratas. Tesis de licenciatura. Escuela de Dietética y Nutrición del ISSSTE; 2013.
140. Wallace DL, Han MH, Graham DL, Green TA, Vialou V, Íñiguez SD, et al. CREB regulation of nucleus accumbens excitability mediates social isolation-induced behavioral deficits. *Nat Neurosci.* 2009;12(2):200-209.
141. Barrot M, Wallace DL, Bolaños CA, Graham DL, Perrotti LI, Neve RL, et al. Regulation of anxiety and initiation of sexual behavior by CREB in the nucleus accumbens. 2005;102(23): 8357–8362.
142. Kornhauser JM, Cowan CW, Shaywitz AJ, Dolmetsch RE, Griffith EC, Hu LS, et al. CREB Transcriptional Activity in Neurons Is Regulated by Multiple, Calcium-Specific Phosphorylation Events. *Neuron,* 2002;34:221–233.
143. Zirpel L, Janowiak MA, Veltri CA, Parks TN. AMPA Receptor-Mediated, Calcium-Dependent CREB Phosphorylation in a Subpopulation of Auditory Neurons Surviving Activity Deprivation. *J Neurosci.* 2000;20(16):6267–6275.
144. Nijholt I, Blank T, Ahi J, Spiess J. In vivo CREB phosphorylation mediated by dopamine and NMDA receptor activation in mouse hippocampus and caudate nucleus. *Brain Res Gene Expr Patterns.* 2002;1(2):101-6.

145. Gau D, Lemberger T, von Gall C, Kretz O, Le Minh N, Gass P, et al. Phosphorylation of CREB Ser142 Regulates Light-Induced Phase Shifts of the Circadian Clock. 2002;34(2):p245–253.
146. Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 1993;58(1):140-5.
147. 150. Kóvacs KJ, Sawchenko PE. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci*. 1996; 16(1):262-273.
148. Stratford TR, Kelley AE. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J Neurosci*. 1997;17(11):4434-4440.
149. Leininger GM. Lateral thinking about leptin: a review of leptin action via the lateral hypothalamus. *Physiol Behav*. 2011;104(4):572-581.
150. Will MJ, Franzblau EB, Kelley AE. Nucleus Accumbens  $\mu$ -opioids regulate intake of a high fat diet via activation of a distributed brain network. *J Neurosci*. 2003;23(7):2882-2888.
151. Castañeda TR, Márquez de Prado B, Prieto D, Mora F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J Pineal Res*. 2004;177-185.
152. Fraga Lopes AP, Ganzer L, Borges AC, Kochenborger L, Januário AC, Serralvo Faria M, et al. Effects of GABA ligands injected into the nucleus accumbens shell on fear/anxiety-like and feeding behaviour in food deprived rats. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;101(1):41-48.
153. Reynolds SM, Berridge KC. Positive and negative motivation in nucleus accumbens shell: bivalent rostrocaudal gradients for GABA-elicited eating, taste “liking”/“disliking” reactions, place preference/avoidance, and fear. *J Neurosci*. 2002;22(16):7308-7320.
154. Reynolds SM, Berridge KC. Glutamate motivational ensembles in nucleus accumbens: rostrocaudal shell gradients of fear and feeding. *Eur J Neurosci*. 2003;17:2187-2200.



155. Metcalf G, Dettmar PW. Is thyrotropin releasing hormone an endogenous ergotropic substance in the brain? *Lancet*. 1981;1:586-9.
156. Morrison SF, Nakamura K, Madden CJ. Central control of thermogenesis in mammals. *Exp Physiol*. 2008;93(7):773-797.
157. Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM, et al. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 1987;238:78-80.
158. Chiappini F, Ramadoss P, Vella KR, Ye FD, Stuart RC, Nillni EA, Hollenberg AN. Family members CREB and CREM control thyrotropin-releasing hormone (TRH) expression in the hypothalamus. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;365(1):84-94.
159. Hollenberg AN. The role of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuron as a metabolic sensor. *Thyroid*. 2008;18(2):131-9.
160. Sugrue ML, Vella KR, Morales C, Hollenberg AN. The thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone at level of transcription in vivo. *Endocrinology*. 2010;151(2):793-801.
161. Hsieh YS, Yang SF, Kuo SY. Intracerebral administration of protein kinase A or cAMP response element-binding protein antisense oligonucleotide can modulate amphetamine-mediated appetite suppression in free-moving rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;292:E123-E131.
162. Hsieh YS, Yang SF, Chu SC, Ho YJ, Kuo CS, Kuo DYI. Transcriptional interruption of cAMP response element binding protein modulates superoxide dismutase and neuropeptide Y-mediated feeding behavior in freely moving rats. *Journal of Neurochemistry*. 2008;105:1438-1449.
163. Hosseini-Sharifabad A, Ghahremani MH, Sabzevari O, Naghdi N, Abdollahi M, Beyer C, et al. Effects of protein kinase A and G inhibitors on hippocampal cholinergic markers expressions in rolipram-and sildenafil-induced spatial memory improvement. *Pharmacol Biochem Behav*. 2012;101(3):311-9.
164. Yang L, Calingsan NY, Lorenzo BJ, Beal MF. Attenuation of MPTP neurotoxicity by rolipram, a specific phosphodiesterase IV. *Exp Neurol*. 2008;211(1):311-314.

165. Coppola A, Meli R, Diano S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology*. 2005 Jun;146:2827-33.

166. Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology*. 1991 Nov;129:2714-8.