



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Fenotipo de las células que expresan a la enzima que degrada a la hormona liberadora de tirotropina, la piroglutamil peptidasa II, en el hipocampo de la rata adulta

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Vargas Orihuela Karla Yamili

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Jean-Louis Charli Casalonga  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Christopher Wood  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Dra. Edith Sánchez Jaramillo  
Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CD.MX., OCTUBRE , 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

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

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

A los miembros de mi comité de jurados el Dr. Takuya Nishigaki Shimizu, Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay, Dra. Viviana Valadez Graham, Dr. Ernesto Ortiz Suri y Dra. Clorinda Arias; por la dedicación de su valioso tiempo a la lectura y sus comentarios que me ayudaron a finalizar este proyecto.

Agradecimiento a la Dra. Sandra Petersen por regalarnos amablemente la sonda de ADNc de GAD65, a la IBI Marcela Ramírez Yarza por sus cuidados a los animales empleados en estos experimentos. A la Química Fidelia Romero Arteaga un reconocimiento a su trabajo y colaboración en la digestión y purificación de los plásmidos utilizados en este trabajo; de igual manera al Q.F.B. Miguel Cisneros Ramírez por la realización de los radioinmunoensayos. Su apoyo técnico favoreció enormemente al proyecto. Al Sr. Manuel Villa Herrera y la Sra. Elena Martel por facilitar los materiales utilizados en los experimentos.

Por brindarme un ambiente de calidez y trabajo en equipo agradezco a mis compañeros y amigos por todo su apoyo y momentos inolvidables dentro del laboratorio, Melisa Rosas, Iván Lazcano, Adrián Pérez Maldonado, Israim Sotelo, Adair Rodríguez, David Villaseñor, Edgar Palacios, Ricardo Ayala y Natalia de la Cruz. Al Instituto de Biotecnología por abrirme las puertas a un mundo nuevo de trabajos e investigadores de alto nivel.

Un especial agradecimiento al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por haberme otorgado una beca para realizar mis estudios de maestría y la asistencia al XXIX Congreso Nacional de Bioquímica, llevado a cabo del 11 al 17 de Noviembre del 2012 en Oaxaca, Oax

Finalmente quiero agradecer al personal del bioterio del Instituto de Biotecnología y al apoyo otorgado por parte del CONACyT, 15h931 (JLC) y la DGAPA-UNAM IN206712; IN221109 (JLC).

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	5
<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
1. La comunicación intercelular en el cerebro .....	9
2. Los péptidos y la comunicación nerviosa .....	9
<b>ANTECEDENTES</b>	
1. La hormona liberadora de tirotrópina .....	14
1.1. Acción endócrina y central de la TRH en el SNC .....	14
2. La TRH liberada al medio extracelular es hidrolizada por la piroglutamil peptidasa II .....	17
2.1. Función y características generales de la PPII .....	17
2.2. La descripción bioquímica de la enzima revela características únicas .....	19
2.3. La PPII controla la eficacia de la acción de la TRH en contextos endócrinos y centrales .....	19
3. En el hipocampo, la TRH modula la comunicación por neurotransmisores clásicos .....	22
3.1. El circuito hipocampal tri-sináptico .....	22
3.2. Distribución de las neuronas GABAérgicas en el hipocampo .....	24
3.3. Distribución de las neuronas glutamatérgicas en el hipocampo ....	26
3.4. Papel y distribución de los astrocitos en el hipocampo .....	28
3.5. Origen de la TRH presente en el hipocampo .....	30
3.6. Papel de la TRH y sus elementos de respuesta en el hipocampo,	

en modelos experimentales de la epilepsia y el aprendizaje .....	32
3.7. La TRH modula la comunicación sináptica mediada por neurotransmisores clásicos en el hipocampo .....	35
3.8. Algunos elementos que contrastan la comunicación TRHérgica en el hipocampo con la neocorteza .....	36
4. Fenotipificación de las células en el hipocampo que expresan el ARNm de la PPII .....	36
4.1. En el hipocampo, algunas de las células que expresan a la PPII son neuronas GABAérgicas .....	36
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	39
<b>HIPÓTESIS</b> .....	40
<b>OBJETIVOS</b> .....	40
<b>METODOLOGÍA</b> .....	41
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
1. Material y H <sub>2</sub> O .....	41
2. Animales .....	41
3. Obtención de cerebros por el método de perfusión cardiaca y congelamiento .....	41
4. Inmunocitoquímica (ICC) en tejidos en flotación .....	45
5. Transcripción <i>in vitro</i> de la PPII con el nucleótido <sup>35</sup> S α-UTP .....	48
6. Ensayo de inmunohistoquímica combinado con la técnica de hibridación <i>in situ</i> .....	49
6.1. Lavados anteriores a la hibridación .....	49
6.2. Preparación de la mezcla de hibridación .....	50
6.3. Hibridación <i>in situ</i> .....	51

6.4. Lavados posteriores a la hibridación .....	51
6.5. Detección de la actividad con emulsión fotográfica .....	52
6.6. Revelado de la emulsión fotográfica .....	53
6.7. Contra-tinción de laminillas con violeta de cresilo .....	53
7. Doble hibridación <i>in situ</i> con las sondas PPII <sup>35</sup> S α-UTP, GAD65 y VGLUT -1 digoxigenina 11 α-UTP .....	54
7.1. Transcripción <i>in vitro</i> de la sonda GAD65 y VGLUT—1 con digoxigenina 11 α-UTP .....	54
7.2. Tratamiento de pre- hibridación de los tejidos perfundidos .....	55
7.3. <i>Buffer</i> de hibridación .....	56
7.4. Doble hibridación <i>in situ</i> .....	56
7.5. Lavados post- hibridación y detección de la digoxigenina .....	57
8. Análisis de las imágenes .....	58

## RESULTADOS

1. Las células astrogliales del hipocampo de la rata adulta no expresan el ARNm de la PPII
  - 1.1. Distribución de las células astro-gliales en el hipocampo de la rata macho adulta ..... 60
  - 1.2. Detección del ARNm de la PPII del hipocampo en tejidos marcados previamente con anti-GFAP ..... 62
2. Las células de tipo neuronal del hipocampo de la rata adulta expresan el ARNm de la PPII
  - 2.1. Distribución de la proteína enolasa específica de neuronas en el hipocampo de la rata macho adulta ..... 64
  - 2.2. Detección del ARNm de la PPII del hipocampo en tejidos

marcados previamente con $\alpha$ -enolasa .....	66
3. Las células glutamatérgicas del hipocampo de la rata adulta co-expresan el ARNm de la PPII	
3.1. Distribución del ARNm de VGLUT1 en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta .....	67
3.2. Distribución del ARNm de la PPII en tejidos marcados con la sonda contra el ARNm de VGLUT1 en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta .....	68
3.3. Distribución de la proteína VGLUT-1 en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta .....	69
3.4. Detección del ARNm de la PPII del hipocampo en tejidos marcados previamente con $\alpha$ -VGLUT1 .....	72
4. Análisis preliminar del fenotipo de las células que expresan el ARNm de la PPII en la corteza frontal	
4.1. Distribución de las células que co-expresan el ARNm de GAD65 y PPII en la corteza frontal de la rata macho adulta .....	74
4.2. Relación entre las células que expresan a la PPII y las señales de VGLUT1 en la corteza frontal de la rata adulta .....	77
<b>DISCUSIÓN</b> .....	78
<b>CONCLUSIONES</b> .....	87
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	88
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	89
<b>ANEXOS</b> .....	99
1. Protocolo para producción a escala “midi-prep” mediante el método de QIAGEN “plasmid Midi kit” para plásmidos con alto número de copias (20-	

100 µg) .....	99
2. Protocolo para la linearización de los plásmidos utilizados para la hibridación <i>in situ</i> .....	101
3. Detección de la incorporación de la digoxigenina 11 α-UTP a los transcritos durante la transcripción <i>in vitro</i> .....	103
4. Hidrólisis alcalina de la sonda GAD65 y VGLUT-1 digoxigenina 11 α-UTP por el método de buffer de carbonatos .....	104



**ABREVIATURAS**

AP	Adenohipófisis
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
CA	Cuerno de Ammon
CO	Monóxido de carbono
CKK	Colecistoquinina
DAB	Diaminobenzidina
dig	Digoxigenina
EC	Corteza entorrinal
GABA	Acido y aminobutírico
GAD	Descarboxilasa del ácido glutámico
GD	Giro dentado
icv	intra-cerebroventricular
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
NO	Óxido nitroso
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
PAM	peptidil glicil $\alpha$ monooxigenasa
PC	Convertasa de proteína
PE	Prolil endopeptidasa
POD	Peroxidasa alcalina
PPI	Piroglutamil peptidasa I
PPII	Piroglutamil peptidasa II
PRL	Prolactina

RER	Retículo endoplásmico rugoso
SNC	Sistema nervioso central
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TRH-R	Receptores de la hormona liberadora de tirotrópina
TSH	Hormona estimuladora de la tiroides o tirotrópina
VGLUT	Transportador vesicular de glutamato

## RESUMEN

Diversas evidencias experimentales relacionan a la hormona liberadora de tirotropina (TRH), un tripéptido, con el aprendizaje y la memoria en el hipocampo. Sus efectos neuromoduladores parecen contribuir a la coordinación de estos eventos, los cuales son sostenidos por la transmisión GABAérgica y glutamatérgica. La piroglutamil peptidasa II (PPII) es un ectoenzima altamente específica para la TRH, su único sustrato con función biológica conocido. Se postula que esta ectoenzima, localizada principalmente en el compartimiento post-sináptico de sinapsis químicas, hidroliza la TRH que es liberada al medio extracelular del cerebro, terminando eficazmente con su acción. El hipocampo es una región que presenta gran expresión y actividad de la PPII, pero se desconoce el fenotipo de las células que expresan el ARNm de la enzima, un dato muy importante para dilucidar su papel fisiológico.

El ARNm de la PPII está ampliamente concentrado en la capa de células piramidales del cuerno de Ammon (CA) del hipocampo, con patrones de expresión diferenciales. En este trabajo se intentó aclarar el fenotipo de las células que expresan el ARNm de la PPII en el hipocampo de la rata macho adulta. Las células que expresan el ARNm de la PPII se identificaron a través de hibridación *in situ* con una sonda de ARN radioactiva. Lo primero que quisimos aclarar fue si el ARNm de la PPII de esta región, era sintetizado a partir de células de origen glial o neuronal. Nuestro análisis reveló que el ARNm de la enzima PPII está confinado en el hipocampo a las células de tipo neuronal, identificadas a través de la inmunoreactividad de la enolasa específica de neuronas, la cual está presente en grandes cantidades a través de todo el hipocampo. Los astrocitos (un tipo de células gliales) del hipocampo, identificados por la inmunoreactividad de la proteína ácida fibrilar glial no co-localizan con la distribución del ARNm de la PPII, ya que la capa piramidal y granular está desprovista de astrocitos.

Con una sonda de ARN antisentido contra el transportador vesicular de glutamato (VGLUT1) marcada con digoxigenina, se logró identificar la distribución de células glutamatérgicas del hipocampo, que son abundantes en la capa piramidal y granular de todas las subregiones hipocámpales, siendo más prominentes en CA3 y el GD. Se observó que una cantidad importante de estas células co-expresa el ARNm de la PPII. Estos resultados son complementados por resultados que muestran que células del hipocampo que expresan al ARNm de la PPII son rodeadas por botones sinápticos de glutamato, marcados con un

anticuerpo anti-VGLUT1, y que fueron observados a través de una reacción colorida.

Estos datos, apoyan las evidencias que han señalado un papel regulador de la TRH sobre las neuronas glutamatérgicas del hipocampo y la corteza cerebral. Los resultados de estas observaciones, sugieren que esta acción pudiera ser controlada por la PPII. Sabemos además que la TRH regula la actividad de neuronas GABAérgicas del hipocampo, y demostramos que la PPII se expresa en estas neuronas. La co-localización del mensajero de la PPII con la sonda de ARN antisentido GAD65, en neuronas del tipo GABAérgico fue reportada a través de toda la formación hipocampal, siendo más prominente en células piramidales del cuerno de Ammon y granulares del giro dentado. Por lo tanto en el hipocampo, dos tipos neuronales distintos expresan la PPII.

Interesantemente esta dicotomía parece también ocurrir en la corteza frontal, en la cual se observa un mismo patrón de co-localización VGLUT1-PPII, en todas las capas, excepto en la capa IV, que no presenta señal VGLUT1. Además, la corteza cerebral contiene una gran cantidad de células que expresan el ARNm de GAD65; en su totalidad, estas células parecen co-expresar el ARNm de la PPII a través de todas las capas de la corteza, sugiriendo que la PPII se expresa en todas las células GABAérgicas de la corteza.

En conclusión, la distribución dual de la PPII en neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en el hipocampo y la neocorteza sugiere que controla la comunicación TRHérgica en varios contextos fisiológicos.

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. La comunicación intercelular en el cerebro**

Una parte significativa de la comunicación intercelular en los sistemas nerviosos se lleva a cabo a través del envío y decodificación de señales químicas, en particular al nivel de especializaciones llamadas sinapsis. Una clase de señales químicas la conforman neurotransmisores clásicos, en particular el ácido glutámico y el ácido gama aminobutírico (GABA), que son sintetizados en la terminal nerviosa donde se encuentran las enzimas responsables de su síntesis, enzimas que han viajado desde el soma. En la terminal nerviosa, los neurotransmisores son concentrados en las vesículas sinápticas por proteínas llamadas transportadoras vesiculares. La fusión de las vesículas sinápticas a la membrana plasmática de las neuronas y la liberación de su contenido al medio extracelular ocurre de forma regulada, en respuesta a la llegada de un potencial de acción. En el espacio sináptico estos neurotransmisores son reconocidos por receptores específicos localizados en las células blanco donde ejercen algún cambio en la actividad eléctrica y bioquímica. La inactivación de los neurotransmisores se lleva a cabo en general, por proteínas transportadoras plasmáticas, presentes en las membranas sinápticas, encargadas de remover al neurotransmisor del espacio sináptico. Las neuronas que sintetizan y utilizan al ácido glutámico o el GABA para comunicación intercelular se encuentran ampliamente distribuidas en todas las regiones del cerebro y constituyen la principal fuente de estimulación o inhibición de la actividad eléctrica. Su función es crítica para la vida. Por ejemplo, la transmisión glutamatérgica contribuye a la plasticidad detectada en varios paradigmas de aprendizaje (Joseph-Bravo et al., 2007).

Sin embargo, la comunicación intercelular en el cerebro es mucho más rica que la adscrita a los neurotransmisores clásicos. Otras moléculas de naturaleza química muy variada como hormonas periféricas (esteroides), proteínas, péptidos, derivados lipídicos (endocannabinoides), nucleótidos (ATP), gases (NO, CO), participan también como mensajeros de la comunicación nerviosa.

### **2. Los péptidos y la comunicación nerviosa**

El reconocimiento de los péptidos como una gran familia de moléculas mensajeras involucradas en la comunicación nerviosa empieza en la década de los 70 del siglo XX con el

descubrimiento de los péptidos hipotalámicos. El hipotálamo es una región del cerebro que integra señales de diferentes fuentes hacia un final común: las neuronas hipotalámicas que regulan la función endócrina de la pituitaria anterior.

Los modos de biosíntesis, liberación, acción e inactivación de los neuropéptidos tienen algunas diferencias clave cuando se comparan con los neurotransmisores clásicos. En las neuronas los péptidos son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, en forma de proteínas de alto peso molecular que son procesadas en la vía de secreción regulada por la acción secuencial de varias enzimas, siendo un evento inicial la actividad de las convertasas, enzimas que hidrolizan la cadena peptídica de manera controlada al nivel de pares de aminoácidos básicos. En seguida una carboxipeptidasa remueve generalmente los aminoácidos básicos que se encuentran del lado C-terminal de los péptidos en formación. Se pueden así formar varios péptidos, a partir de un solo precursor, con actividades biológicas distintas. Las proteínas precursoras de los péptidos y las enzimas procesadoras son empaquetadas, a partir del trans-Golgi, en vesículas de propiedades distintas a las de las vesículas sinápticas, los gránulos de secreción. El procesamiento del precursor ocurre principalmente dentro de los gránulos de secreción, que se acumulan en la terminal nerviosa y se fusionan con la membrana plasmática en respuesta a la llegada de trenes de potenciales de acción o en respuesta a neurotransmisores cuyos receptores estén cercanos a la terminal nerviosa. Los péptidos liberados al espacio sináptico actúan sobre receptores, a veces localizados lejos del sitio de liberación, que son casi siempre de tipo metabotrópico (figura 1). Por lo tanto, los péptidos no afectan rápidamente al potencial de membrana (lo pueden hacer en forma más lenta), pero modulan la actividad de los neurotransmisores clásicos, amplificando o modulando su acción de múltiples maneras, por lo que se les ha clasificado en la categoría general de neuromoduladores. Su inactivación, una vez liberados, opera principalmente por la acción de peptidasas.

Actualmente, la lista de péptidos se ha incrementado considerablemente y se conocen al menos un centenar de ellos. Las funciones que desempeñan estas moléculas aún se encuentran en vía de exploración, aunque se sabe que son muy numerosas y que dependen estrechamente del tipo neuronal que los secreta (Joseph-Bravo et al., 2007).

La eficacia de la transmisión sináptica a través de péptidos depende de su tasa de secreción, de los mecanismos de transducción al nivel del receptor, de la velocidad de eliminación del péptido, y de cómo éstos son a su vez regulados.

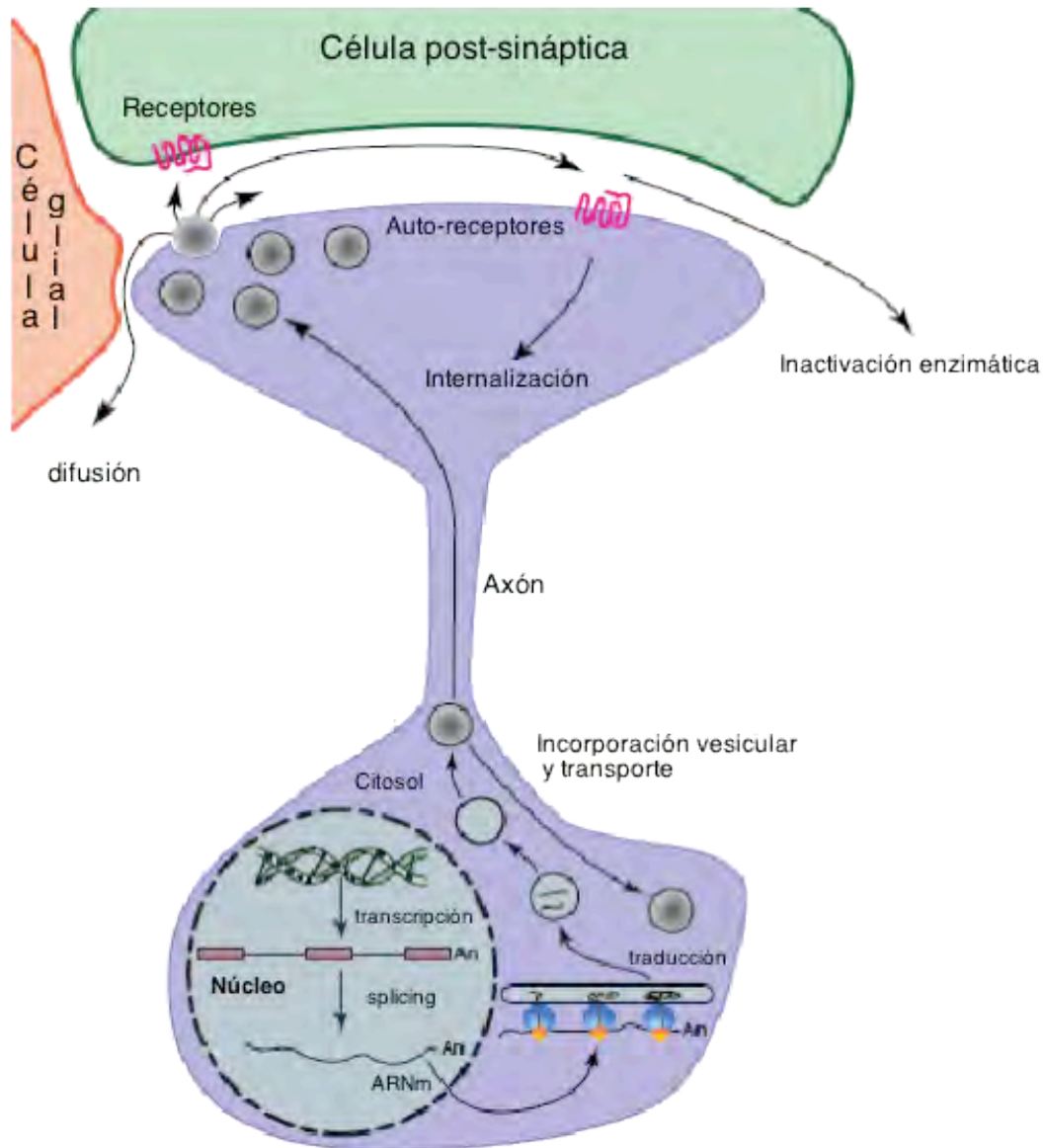


Figura 1. La comunicación intercelular mediada por péptidos en los sistemas nerviosos. Los péptidos son sintetizados en el soma de neuronas y transportados a través de vesículas de secreción por el axón hasta alcanzar la terminal nerviosa; aquí son almacenados y secretados hacia el medio extracelular en respuesta a un estímulo. Finalmente son reconocidos por receptores específicos presentes en la membrana plasmática de las células post-sinápticas blanco, donde ejercen su acción (Imagen tomada de Bear M.F., Connors B.W y Paradiso M.A. *Neuroscience: exploring the brain*. 2001).

Las peptidasas son enzimas que poseen la habilidad de hidrolizar enlaces peptídicos mediante un ataque nucleofílico al grupo carbonilo. Las ectopeptidasas son enzimas ancladas a la membrana plasmática de las células, en general a través de un segmento que atraviesa la membrana plasmática. Tienen además un dominio intracelular pequeño, y un dominio catalítico orientado al medio extracelular, en posición ideal para llevar a cabo la hidrólisis de los péptidos liberados al medio extracelular, controlando así su vida media. Si su sitio catalítico está conformado por el extremo amino terminal, la enzima pertenecerá al grupo de ectopeptidasas de tipo I; por el contrario si está conformado por su extremo carboxilo terminal, pertenecerá al tipo II. Existen otros tipos de ectopeptidasas que no atraviesan la membrana plasmática, sino que están asociadas a la membrana plasmática o la matriz extracelular mediante un motivo glicosil-fosfatidil inositol (GPI). Otras pasan por modificaciones post-transcripcionales y/o post-traduccionales que las lleva a ser secretadas al espacio extracelular en forma de enzimas solubles (figura 2). En general, las peptidasas presentan un amplio espectro de especificidad, por lo que pueden degradar a varios péptidos; por ejemplo, la neprilisina (NEP), la aminopeptidasa N (APN) o la enzima convertidora de angiotensina (ACE) pueden degradar *in vitro* a péptidos tan variados como los péptidos opioides, la colecistokinina, la somatostatina y la sustancia P (O'Cuinn et al., 1995). Una excepción es la piroglutamil peptidasa II (PPII), cuyo único sustrato conocido es la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Charli et al., 1998).





Figura 2. Principales sitios de acción de peptidasas en el cerebro. Las ectopeptidasas están unidas a la membrana plasmática de células post-sinápticas a través de un dominio transmembranal y un dominio intracelular pequeño; su sitio catalítico está en el dominio extracelular orientado de forma idónea para hidrolizar a los péptidos liberados al medio extracelular. Existen además, peptidasas ancladas a la matriz extracelular a través de un motivo GPI, o ectopeptidasas que sufren un corte proteolítico que las libera al espacio extracelular y se encuentran en forma soluble (Imagen tomada de Bear M.F., Connors B.W y Paradiso M.A. *Neuroscience: exploring the brain*. 2001).

## **ANTECEDENTES**

### **1. La hormona liberadora de tirotropina**

#### **1.1. Acción endócrina y central de la TRH en el SNC**

La hormona liberadora de tirotropina (TRH), fue el primer neuropéptido hipotalámico en ser caracterizado en la década de los 70's del siglo XX (Guillemin, 1978; Schally, 1978). Posee una estructura poco convencional conformada por tres aminoácidos y con ambos extremos bloqueados por una modificación post-traducciona (piroGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>). Originalmente, la TRH fue relacionada con funciones endócrinas por su participación en la síntesis y liberación de tirotropina (TSH) de la adenohipófisis (AP). Más adelante, fue detectada en las regiones límbicas del cerebro, donde también fueron detectados sus receptores, extendiendo su función a la de un neuromodulador (O'Leary y O'Connor, 1995). Su papel hipofisiotrópico, está confinado a las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV), donde se lleva a cabo su síntesis. Las terminales nerviosas de estas neuronas, proyectan a la eminencia media (EM) del hipotálamo, donde el péptido maduro es almacenado dentro de gránulos de secreción, hasta el momento de su liberación hacia la AP a través de un sistema portal. En esta glándula, la TRH es responsable de estimular la síntesis y liberación de la TSH, la cual es responsable de la síntesis y secreción de las hormonas tiroideas (HT), relacionadas con la regulación del metabolismo energético en casi todas las células del organismo. Las HT controlan por retroalimentación negativa sobre el eje tiroideo a través de regulación negativa de los niveles del ARNm de la TRH en el NPV y de la regulación positiva de la enzima encargada de la inactivación de la TRH liberada al medio extracelular en la EM, la PPII (Bauer et al., 1976, 1988; Ponce et al., 1988; Schomburg et al., 1995; Nillni y Sevarino, 1999; Fekete et al., 2000; Sánchez et al., 2009). Una amplia gama de estímulos fisiológicos como la exposición de los animales al frío o la succión de leche materna por parte de las crías, causa una activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HPT), provocando la liberación de la TRH de las terminales nerviosas, la secreción de TSH y el aumento rápido y transitorio de los niveles del ARNm de la TRH (Uribe et al., 1993; Sánchez et al., 2001). Un caso contrario, es la inhibición del eje que ocurre en el ayuno, cuando los animales sometidos a una restricción alimenticia, presentan una disminución en la expresión y liberación de la TRH del NPV y niveles circulantes bajos de TSH y HT (van Haasteren, GAC et al., 1995).

La acción de la TRH sobre sus células blanco es mediada por la unión del péptido liberado al medio extracelular a uno de dos receptores de membrana específicos denominados TRH-R1 y TRH-R2. Aunque son codificados por genes distintos, presentan características de unión a ligando similares. Sus secuencias de aminoácidos presentan un 50% de similitud y la distribución de su ARNm es diferencial en el SNC de los roedores (Heuer et al., 2000; Sun et al., 2003). Ambos, pertenecen a la familia de receptores asociados a proteínas G y su activación desencadena una cascada de señalización que favorece por un lado, la activación de la vía MAPK, y por otro lado, la liberación de calcio intracelular, debido a la hidrólisis de fosfatidil-inositol 4,5-P2 por fosfolipasa C, y la subsecuente activación de la vía de señalización dependiente de calcio/calmodulina y de la PKC, que conllevan a múltiples efectos que incluyen la activación de los factores de transcripción CREB y AP-1, respectivamente (Hsieh y Martin, 1992).

La amplia distribución en el cerebro del ARNm de la pro-TRH, sus receptores y la enzima PPII (Heuer et al, 2000; figura 3), aunada a múltiples efectos sobre la conducta observados después de la administración periférica, intracerebroventricular (icv) o intranuclear de la TRH, apoyan su papel como neuromodulador y neurotransmisor, implicado en procesos de atención y despertar, actividad locomotora, percepción del dolor, depresión y ansiedad, aprendizaje y memoria, funciones autónomas, sensoriales, cardiovasculares, con efectos neuroprotectores y antiepilépticos, entre otros (Horita et al., 1986,1998; Stocca y Nistri, 1995; Gutiérrez-Mariscal et al., 2008, 2012). Se puede considerar a los receptores de TRH y a la PPII como elementos del sistema de respuesta al TRH.

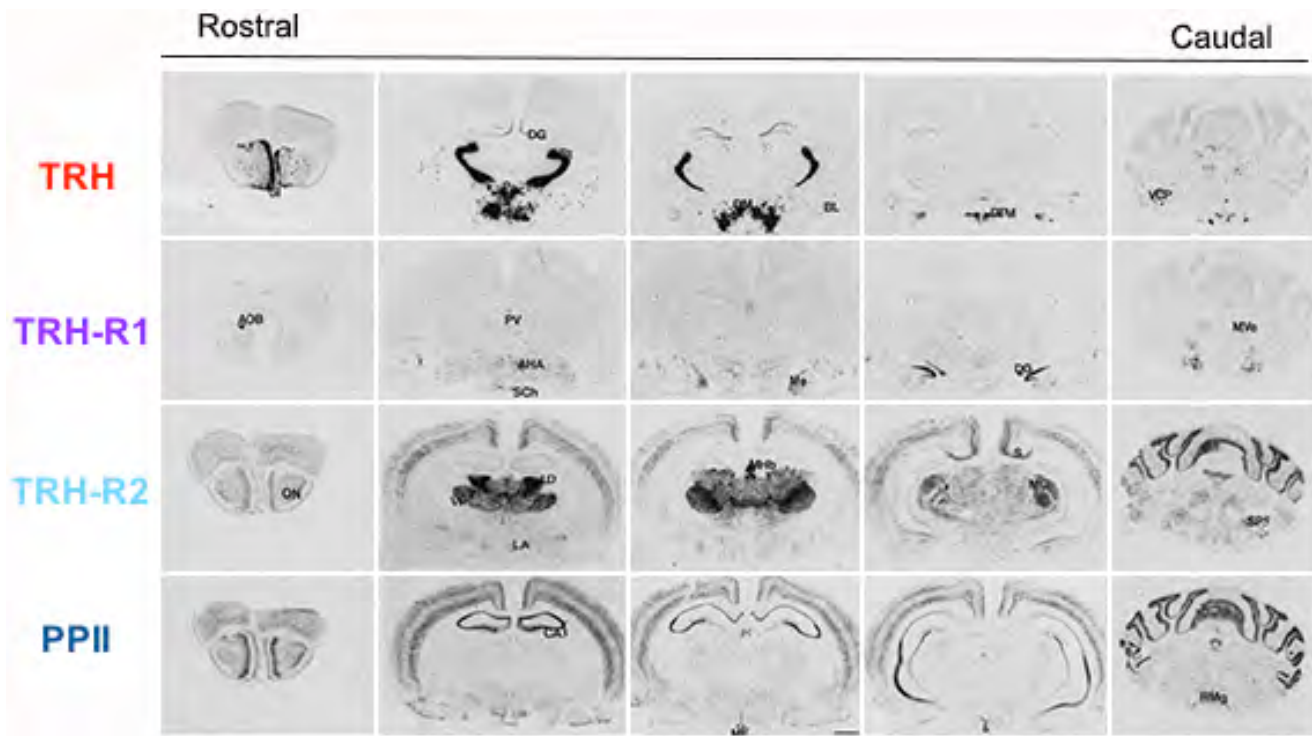


Figura 3. Distribución a nivel rostro-caudal de los ARNm de la pro-TRH, TRH-R1, TRH-R2 y PPII en el cerebro de la rata adulta. La pro-TRH se expresa de manera importante en los núcleos hipotalámicos paraventricular, anterior, dorsomedio, lateral, arcuato y área preóptica media, así como en regiones extra-hipotalámicas como el bulbo olfatorio, corteza cerebral, amígdala, hipocampo, tálamo, cerebelo y tallo cerebral. TRH-R1, tiene una distribución limitada. Algunas células que lo expresan son observadas en el arcuato, amígdala, corteza e hipocampo. TRH-R2, se observa en el tálamo, séptum medio y corteza cerebral. La PPII está presente principalmente en la eminencia media, la corteza frontal, séptum lateral, hipocampo, amígdala e hipotálamo (Imagen modificada de Heuer et al., 2000).

## 2. La TRH liberada al medio extracelular es hidrolizada por la piroglutamil peptidasa II

### 2.1. Función y características generales de la PPII

Una actividad degradadora de la TRH fue identificada en sinaptosomas de membranas del cerebro de ratas y en la adenohipófisis (Joseph-Bravo., 1979; O'Connor y O'Cuinn 1984). Posteriormente, la caracterización de esa actividad reveló una metalo-enzima con actividad piroglutamil peptidasa, por llevar a cabo la hidrólisis del enlace piroglutamil-histidyl de la TRH (Garat et al., 1985; Torres et al., 1986). Fue nombrada piroglutamil peptidasa II (PPII), para distinguirla de la piroglutamil peptidasa I (PPI), cuyas propiedades son muy distintas y no degrada a la TRH *in vivo* (Charli et al., 1988).

La estructura primaria de la PPII, conformada por una secuencia de 1,025 aminoácidos altamente conservados dentro del genoma de la rata, el ratón y el humano (Schauder et al., 1994; Chávez-Gutiérrez et al., 2006), corresponde a una proteína integral de membrana tipo II, con un peso molecular de 116 KDa; sin embargo, un análisis por filtración en gel reveló una masa molecular de 230 KDa, sugiriendo que la enzima consiste de dos subunidades idénticas. Su topografía (figura 4), dilucidada a partir del ADNc, revela un dominio intracelular N-terminal con un sitio potencial de fosforilación, un segmento transmembranal y un dominio extracelular C-terminal, el cual contiene el sitio catalítico de la enzima que presenta la secuencia consenso (His-Glu-X-X-His) y un segundo glutámico separado por 18 aminoácidos, una firma de las metalo-peptidasas de zinc de la familia M1 (Schauder et al., 1994; Bauer et al., 1995). Aunque no existe información experimental precisa sobre la estructura tri-dimensional de la PPII, se han construido modelos hipotéticos a partir de su homología con otras peptidasas la familia M1, a la cual pertenece la PPII, como la aminopeptidasa A y la aminopeptidasa N, que sí tienen estructuras cristalográficas resueltas. En el cerebro, esta ectoenzima está enriquecida en sinaptosomas, evidencia indirecta que sugiere que se encuentra preferencialmente del lado post-sináptico por lo que este dato y la orientación estratégica de su sitio catalítico sugiere una función muy importante en la inactivación extracelular de la TRH (Friedman and Wilk, 1986; Charli et al., 1998, 2006; Bauer et al., 1990; Cruz e al., 1991; Schauder et al., 1994; O'Leary y O'Connor, 1995b). La distribución de su ARNm en el SNC es heterogénea y coincide con la localización del ARNm de al menos uno de los receptores de la TRH (Heuer et al., 2000). Debido a que anticuerpos

específicos para detectar a la PPII han sido todavía poco utilizados, su localización a través de ensayos de su actividad ha sido una herramienta útil en el estudio de su función dentro del SNC. Los sitios con los niveles más elevados de su actividad son la corteza, hipocampo, séptum, cerebelo, bulbo olfatorio, núcleo accumbens y retina; trazas de su actividad son detectables en tejidos periféricos como la adenohipófisis, pulmón, bazo, corazón, músculo esquelético e hígado, mientras que el riñón está desprovisto de su actividad (Friedman and Wilk, 1986; Vargas et al., 1987, 1992; Lazcano et al., 2012). En general, el ARNm de la enzima se distribuye en las regiones donde su actividad se ha detectado (Schauder et al., 1994; Heuer et al., 2000).

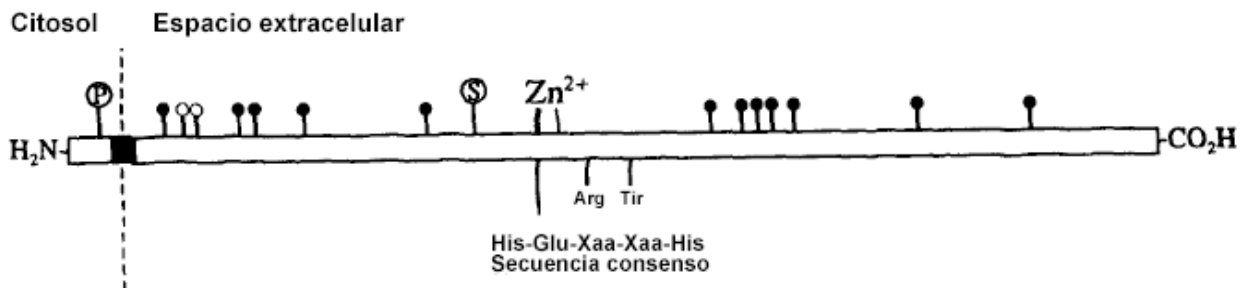


Figura 4. Topografía de la ectoenzima piroglutamil peptidasa II (PPII) dilucidada a partir de la secuencia de su ARNm en la rata. Su estructura primaria revela una ectopeptidasa, perteneciente a la familia de proteínas integrales de membrana tipo II; posee un pequeño dominio intracelular N-terminal, un segmento transmembranal y un dominio extracelular largo con 12 sitios potenciales de n-glicosilación (bolitas negras), un sitio de sulfatación por tirosina (S) y la secuencia consenso His-Glu-X-X-His seguido por otro glutamato separado por 18 aminoácidos, firma del sitio activo característico de las peptidasas de zinc de la familia M1

## 2.2. La descripción bioquímica de la enzima revela características únicas

Sin duda, la característica más extraordinaria de la PPII, es que a diferencia de otras peptidasas, exhibe un alto grado de especificidad por su único sustrato con actividad biológica conocida, la TRH (Charli et al., 1998). Algunos de los requerimientos específicos de la enzima por su sustrato, han sido identificados mediante ensayos de especificidad, empleando péptidos sintetizados químicamente, estructuralmente análogos a la TRH. Los datos revelan que la histidina en la posición P1' de la TRH, es importante tanto en el reconocimiento del péptido, como en la hidrólisis por parte de la enzima. Sin embargo, el sitio S1' de la PPII, parece tolerar ciertas sustituciones por residuos sin carga con estructura poco voluminosa en la posición P1' del péptido, como en el péptido pGlu-Phe-Pro-NH<sub>2</sub>, que es hidrolizado por la PPII purificada a partir de cerebros de bovinos, pero cuya existencia en el cerebro aún es controversial (Kelly et al., 2000).

Aunado a estas observaciones, el desarrollo de herramientas experimentales que permiten la manipulación específica de la enzima, como el uso de inhibidores de su actividad, han recibido un gran interés por parte de los investigadores que estudian las funciones biológicas de la TRH y la PPII, por ejemplo para prolongar la acción terapéutica potencial de la TRH en el SNC. En particular, un inhibidor muy específico, con una Km aparente de 51 nM, aislado a partir de un gusano abundante en las costas de Cuba (HcPI) y cuya administración intraperitoneal en roedores disminuye la actividad de la PPII en varias regiones del cerebro analizadas, entre ellas, el hipotálamo, el cerebelo, los bulbos olfatorios, además de la hipófisis (Pascual et al., 2004), ha sido útil para señalar a la PPII como la enzima responsable de la inactivación *in vivo* de la TRH en ciertos contextos (ver párrafo siguiente). Otros inhibidores, de naturaleza peptídica, generados a partir del conocimiento de la especificidad de la enzima han sido descritos (Kelly et al., 2005).

## 2.3. La PPII controla la eficacia de la acción de la TRH en contextos endócrinos y centrales

Información precisa sobre los sitios de expresión de la PPII, los mecanismos de regulación de su expresión y actividad, y el efecto de inhibidores de la enzima, han permitido apoyar el concepto de que la PPII, podría jugar un papel importante en la regulación de la función de la TRH *in vivo*, por lo menos en ciertos contextos muy precisos.

Un claro ejemplo de que la PPII afecta la eficacia y duración de la acción de la TRH, es observado en el eje neuroendócrino. Los tanicitos de la pared infralateral del tercer ventrículo de la eminencia media expresan a la PPII, y existe evidencia de que esta expresión localiza a la PPII en aposición con los sitios de liberación del TRH (asociaciones axo-gliales), a proximidad de los vasos portales, en una posición ideal para controlar la cantidad de TRH que puede llegar a la adenohipófisis. Un elemento que apoya esta hipótesis es el hecho que los niveles circulantes de las hormonas tiroideas,  $T_3$  y  $T_4$ , regulan a la alta la expresión de la PPII presente en los tanicitos y que en consecuencia puede contribuir a la retroalimentación negativa sobre el eje tiroideo. Finalmente, el uso de inhibidores de la PPII mostró que la PPII controla la cantidad de TRH en el medio extracelular de la eminencia media y que esta actividad impacta sobre la cantidad de TSH liberada por la adenohipófisis en ciertas condiciones fisiológicas (Sánchez et al., 2009, 2013 figura 5).

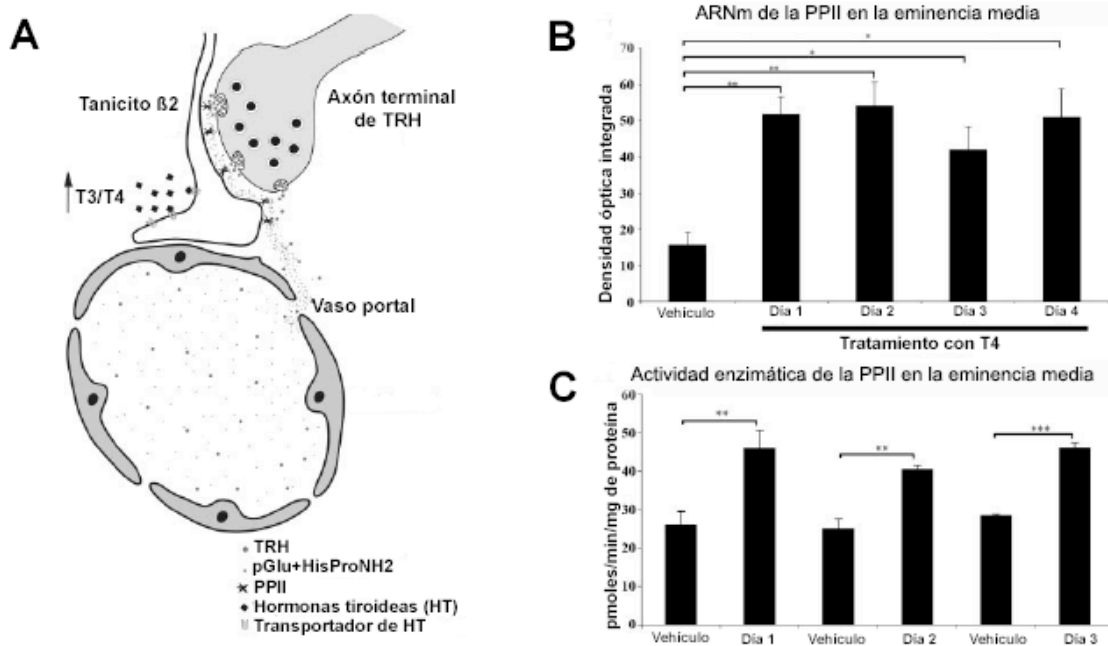


Figura 5. Modelo y evidencias *in vivo* que revelan que la intensidad de la acción de la TRH que llega a la adenohipófisis es controlada por la acción de la PPII de los tanicitos de la EM, y que su actividad es regulada a la alta por las hormonas tiroideas. A. Modelo de interpretación, B. El tratamiento con tiroxina ( $T_4$ ), incrementa los niveles de expresión del ARNm de la PPII en la eminencia media; así como su actividad enzimática, C (Imagen tomada de Sánchez et al., 2009).



Otro ejemplo de un sitio blanco de la acción de la TRH, cuyo efecto e intensidad son controlados por la PPII es el séptum medio, una región implicada en múltiples funciones, incluyendo el control del estado de alerta. Algunas neuronas de esta región co-expresan a la PPII y al receptor TRH-R1, lo que parece tener una consecuencia fisiológica importante para la acción de la TRH, ya que la inhibición local de la actividad de la enzima, incrementa el efecto analéptico (inducción del despertar de un sueño inducido por un narcótico) de la TRH inyectada en esta región (Lazcano et al., 2012, figura 6).

Sin embargo, otros datos muestran que las células que responden a la TRH no siempre expresan a la PPII, y son sensibles a la manipulación de la actividad de PPII. Así, en cultivos primarios de adenohipófisis, se ha observado que la inhibición de la expresión o actividad de la PPII no afecta la eficiencia de la TRH para inducir la liberación de TSH. Esto coincide con el hecho de que los tirotrópos, un tipo de células especializadas en la síntesis de TSH en la adenohipófisis, no expresan a la PPII (Cruz et al, 2008). Por lo tanto, es posible que la relevancia de la PPII para el control de los efectos del TRH varíe de región a región.

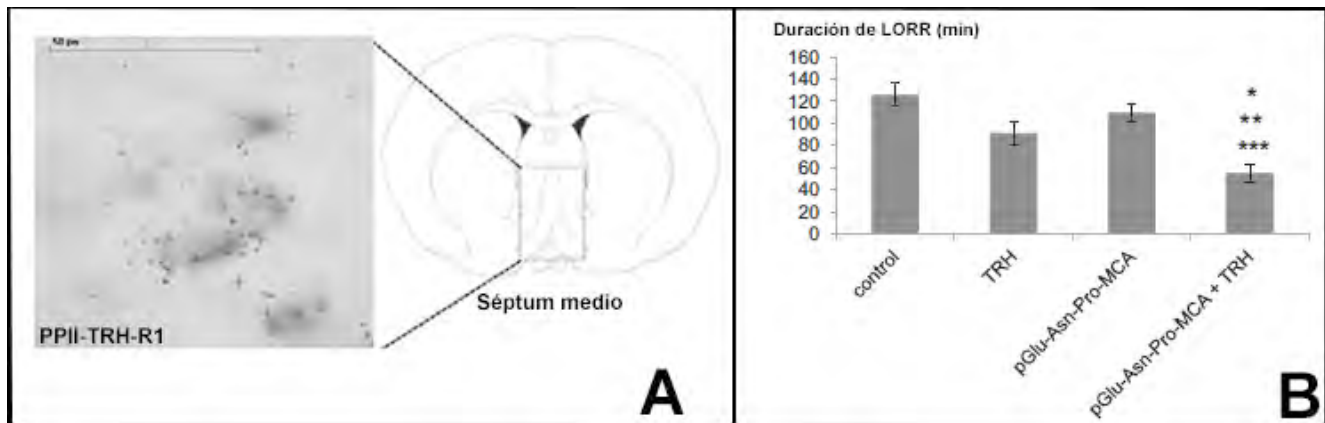


Figura 6. Evidencias *in vivo* de la regulación de la duración e intensidad de la acción de la TRH en el SNC de rata por la PPII. A. Las células PPII del séptum medio (marcadas con una sonda de ARNc PPII-digoxigenina), también coexpresan al ARNm de TRH-R1 (marcadas con una sonda radioactiva que genera granos de plata en una emulsión fotográfica). B. En el séptum medio, la inhibición de la PPII por pGlu-Asp-Pro-MCA amplifica el efecto analéptico de la TRH, lo que induce el despertar de los animales sometidos a narcosis por administración de etanol (Imagen modificada de Lazcano et al., 2012).

### **3. En el hipocampo, la TRH modula la comunicación por neurotransmisores clásicos**

El hipocampo es una región cerebral interesante para continuar el análisis del papel del trinomio TRH-receptores de TRH-PPII. Llama la atención la intensa expresión de la PPII en la capa piramidal, los efectos previamente citados que relacionan TRH e hipocampo, y el hecho que en esta región cerebral cortical, con un origen evolutivo anterior a la neocorteza, el procesamiento de la información está relacionado al proceso de aprendizaje y consolidación de la memoria (O'Keefe et al., 1978). Por otro lado, la arquitectura relativamente simple del hipocampo ha facilitado un análisis detallado de la comunicación sináptica y de su papel fisiológico.

#### **3.1. El circuito hipocampal tri-sináptico**

En la rata el hipocampo está situado en la parte caudal del cerebro (figura 7A). De manera simplificada, es una región que consiste de 2 capas principales de neuronas (el giro dentado y el cuerno de Ammon) dobladas una sobre la otra, que recibe aferencias desde la corteza entorrinal y envía proyecciones hacia la zona rostral del cerebro, a través de la precomisura del fórnix hacia el séptum lateral (Swanson y Cowan, 1977; figura 7B). Está conformado por 3 subregiones, el giro dentado (GD), el cuerno de Ammon (CA) y el subículo. La organización citoarquitectónica de cada subregión revela capas definidas a partir de sus características morfológicas. Dentro del cuerno de Ammon, dividido a su vez en CA1, CA2, CA3 y CA4, la capa de células más profunda es denominada el estrato lacunosum-molecular y abarca únicamente a CA1; por encima de ella se localiza la capa radial, seguida por la capa de células principales o piramidal, y por último la capa oriens hacia la parte más externa; sólo CA3 posee la capa lucidum, un estrato delgado localizado justo entre las capas radial y piramidal. El giro dentado, está organizado en 3 capas, en el extremo apical se localiza la capa molecular, la capa de células granulares y en su extremo basal, la capa de células polimórficas. Finalmente, el hilus, el cual es una prolongación de las capas más profundas de la neocorteza, se encuentra por debajo de la capa polimórfica y está conformado por neuronas de proyección e interneuronas (van Strien et al., 2009; figura 7C). Estas subregiones están intrínsecamente comunicadas a través de proyecciones únicas y unidireccionales que procesan la información proveniente del exterior y que entra al

hipocampo, principalmente a partir de proyecciones aferentes de la corteza entorrinal, denominadas vía perforante. En el modelo clásico el GD se comunica con CA3 a través de la red de fibras musgosas y a su vez CA3 con CA1 a partir de proyecciones de la vía colateral de Shaffer (figura 7D).

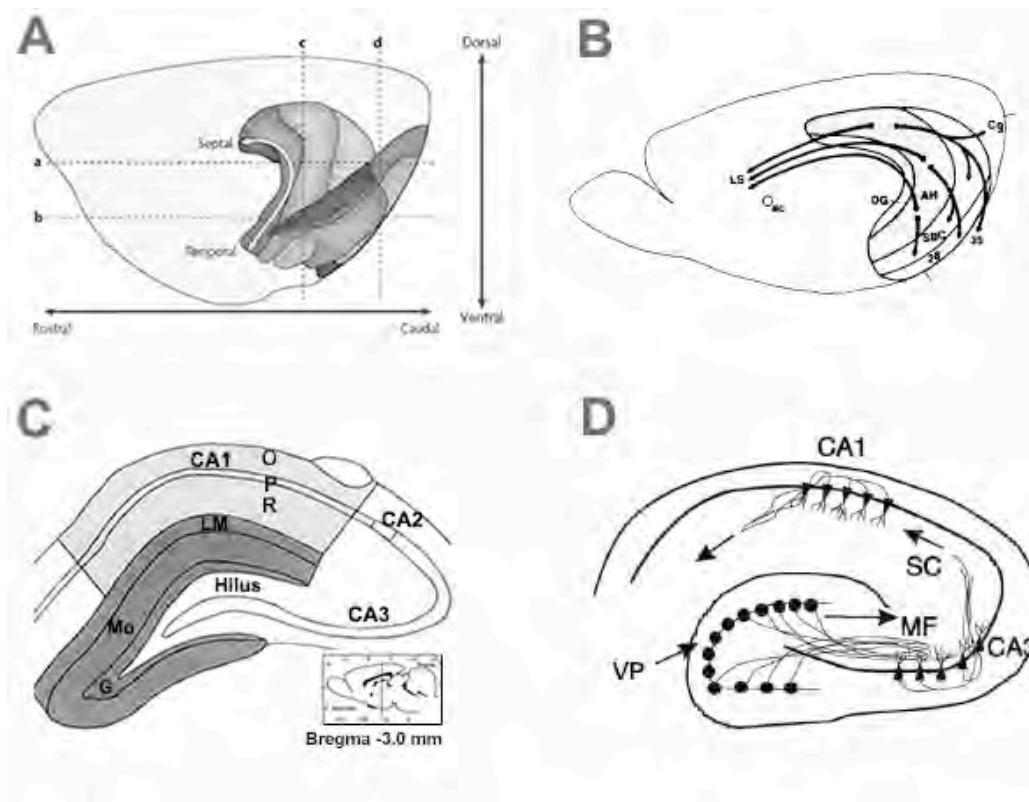


Figura 7. Esquematación de la estructura del hipocampo de rata y su organización citoarquitectónica. A. Plano sagital del cerebro que muestra la localización del hipocampo en la parte caudal del cerebro; las líneas punteadas muestran como se obtienen cortes coronales y transversales al rebanar un cerebro. B. Proyecciones eferentes del hipocampo hacia la zona rostral, preferentemente al séptum lateral a través del fórnix. C. Esquema de un corte coronal que muestra las subregiones hipocámpales y las capas celulares que las conforman (Bregma -3 mm). D. Modelo clásico del circuito tri-sináptico hipocámpal, mostrando las proyecciones aferentes provenientes de la vía perforante (corteza entorrinal) hacia el hipocampo y las vías intrínsecas que proyectan del GD a CA3 a través de la red de fibras musgosas, y de CA3 a CA1 a través de la vía colateral de Shaffer. CA, cuerno de Ammon; GD, giro dentado; G, capa granular del giro dentado; HC, hipocampo; LM, estrato lacunosum-molecular; LS: Séptum lateral; Mo, capa molecular del giro dentado; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; R, estrato radial; SC: vía colateral de Shaffer; Slu: estrato lucidum; VP: vía perforante (Imágenes tomadas de van Strien et al., 2009; Swanson y Cowan, 1977; Paxinos y Watson., 5<sup>th</sup> ed; Gutiérrez et al., 2003).

Las células localizadas dentro de la capa piramidal de CA y granular del giro dentado, son conocidas como el grupo de células principales del hipocampo, ya que son estrictamente de tipo neuronal, tal como es confirmado al analizar el patrón de expresión del ARNm de la enolasa neuronal, una isoforma específica de neuronas encargada de llevar a cabo la catálisis de la transformación de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato durante la glucólisis, que se encuentra en todas las células de estas capas (figura 8).

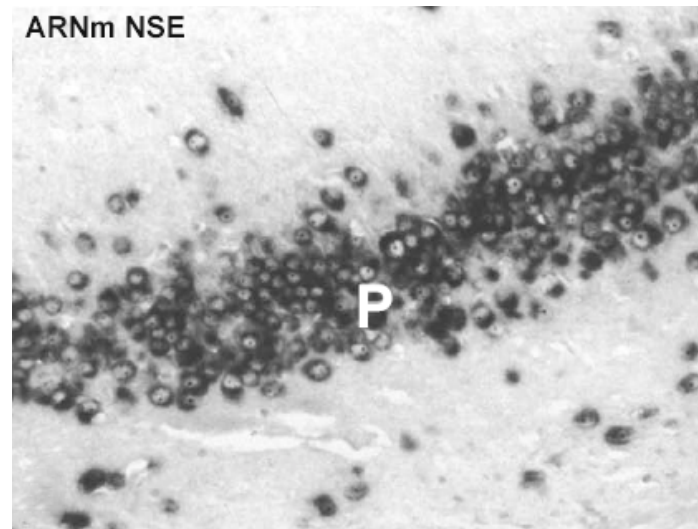


Figura 8. Distribución del ARNm de la enolasa específica de neuronas en la capa piramidal del hipocampo. El ARN es muy abundante pero se encuentra confinado a las capas de células principales del hipocampo de la rata adulta (Landry et al., 1994).

### 3.2. Distribución de las neuronas GABAérgicas en el hipocampo

El GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio de la comunicación sináptica en el SNC. Su síntesis ocurre en las terminales sinápticas de las neuronas GABAérgicas a partir de la descarboxilación de L-glutamato, una reacción irreversible y llevada a cabo por la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD). En el cerebro de los roedores y el humano, se han detectado dos isoformas de la enzima GAD codificadas por el mismo gen, nombradas GAD65 y GAD67 por tener un peso molecular de 65 y 67 KDa, respectivamente. Ambas enzimas son consideradas marcadores específicos de las neuronas GABAérgicas y su

expresión en el SNC es diferencial y complementaria, con algunas pocas excepciones (Erlander y Tobin, 1991; Erlander et al., 1991; Esclapez et al., 1993, 1994; Kaneko y Fujiyama, 2002). El hipocampo es una de las regiones donde los ARNm de GAD65 y GAD67 tienen una distribución muy similar, lo que sugiere que las neuronas GABAérgicas hipocámpales contienen ambas formas de la enzima (figura 9), con células positivas en la capa granular e hilus del giro dentado, y dentro de la capa de células piramidales de CA, así como en la capa oriens de CA3 (Esclapez et al., 1993). Por último, es importante tomar en cuenta que estimulación eléctrica de la vía perforante, induce una sobre-expresión del ARNm de GAD, así como de la síntesis del GABA en células granulares del hipocampo (Sloviter et al., 1994; Schwarzer y Sperk, 1995; Ramírez y Gutiérrez, 2001; Gutiérrez, 2002).

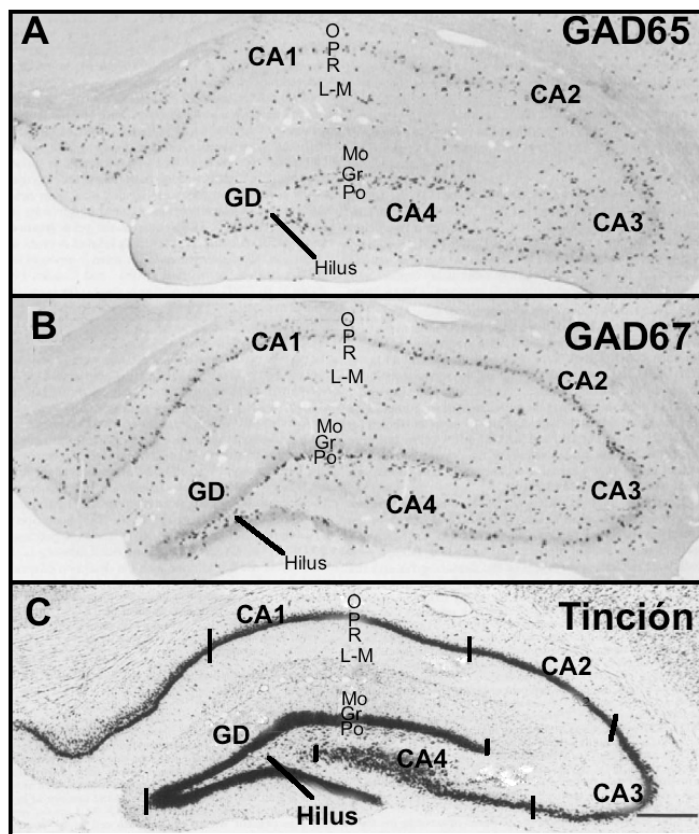


Figura 9. Comparación de la distribución del ARNm de las isoformas GAD65 y GAD67 de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) en el hipocampo de rata macho adulta. A. Distribución del ARNm de GAD65, detectado mediante una sonda acoplada a digoxigenina-11UTP, mostrando la existencia de células positivas a lo largo de todas las subregiones hipocampales, con diferencias en la cantidad de estas células entre subregiones y entre las capas de una misma subregión. B. Distribución del ARNm de GAD67, que muestra una localización similar a GAD65 a través de todas las subregiones hipocampales. C. Tinción de las células principales del hipocampo con el colorante violeta de cresilo. Gr, capa de células granulares; L-M, estrato lacunosum-molecular; Mo, capa de células moleculares; O, capa oriens; P, capa piramidal; Po, capa de células polimórficas; R, capa radial (Imagen modificada de Esclapez et al., 1993).

### 3.3. Distribución de las neuronas glutamatérgicas en el hipocampo

El glutamato es el neurotransmisor excitatorio por excelencia más abundante en el SNC de los mamíferos; su síntesis se lleva a cabo en la terminal nerviosa de las neuronas glutamatérgicas, y su translocación hacia el lumen de las vesículas sinápticas está a cargo del transportador vesicular de glutamato (VGLUT), presente de manera específica en las terminales nerviosas de las neuronas glutamatérgicas. La proteína VGLUT cuenta con tres isoformas (VGLUT 1-3) provenientes de genes distintos, isoformas que presentan una distribución diferencial y complementaria en el cerebro.

En el hipocampo de los roedores adultos, la isoforma dominante es la VGLUT-1 (Ni et al., 1994, 1995; Kaneko y Fujiyama, 2002). Su delección está asociada con la incapacidad de los animales para mantener la potenciación a largo plazo (LTP) en CA1, así como con una reducción en la plasticidad sináptica ante un re-posicionamiento de la plataforma escondida en un paradigma de aprendizaje, el laberinto de agua de Morris (MWM). Esto señala a VGLUT1, como un elemento esencial para la re-adquisición del aprendizaje ante un cambio en el medio externo (Balschun et al., 2009). Como lo reveló un ensayo de hibridación *in situ*, realizado por Ni et al., 1995, la distribución del ARNm de VGLUT-1 es abundante dentro de la capa piramidal de CA, así como en la granular del giro dentado (figura 10).

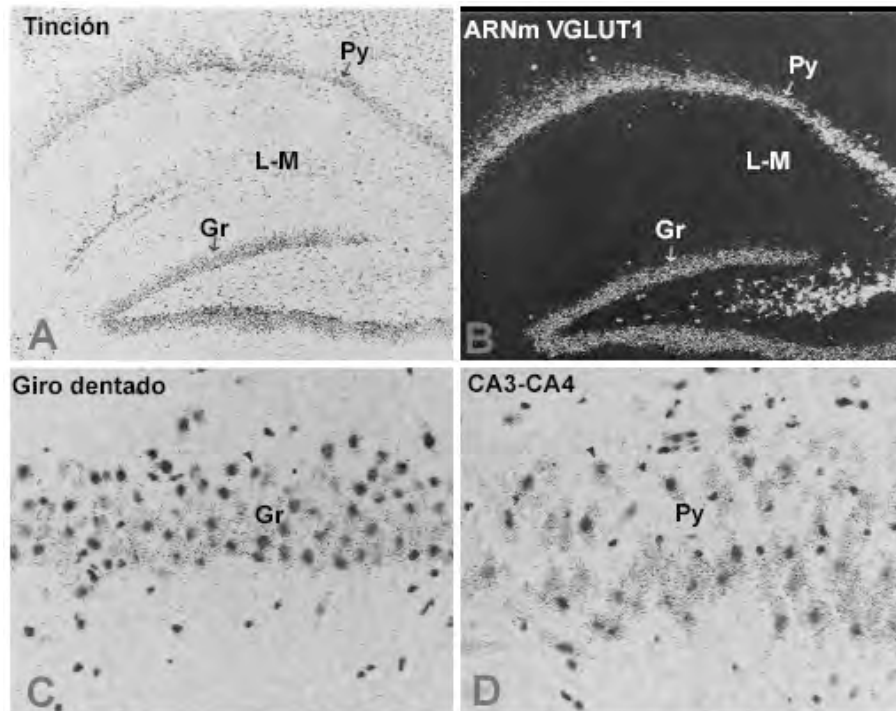


Figura 10. Localización de la expresión del ARNm de VGLUT1 en el hipocampo de rata macho adulta. A. Tinción con violeta de cresilo señalando las capas de células principales del hipocampo. B. Distribución del ARNm de VGLUT1 en la capa piramidal de CA del hipocampo, así como granular del giro dentado. C. Imagen con la magnificación de la señal positiva del ARNm de VGLUT1 (granos de plata), presente en las células granulares del giro dentado contra-teñidas con el colorante violeta de cresilo (círculos color negro). D. Imagen con la magnificación de la señal positiva del ARNm de VGLUT1, presente en las células piramidales de CA3/CA4, contra-teñidas con el colorante violeta de cresilo. Gr, capa de células granulares; L-M, capa lacunosum-molecular; Py, capa piramidal (Imagen modificada de Ni B et al., 1995).

Por otro lado, la distribución de la señal inmunoreactiva para VGLUT-1 a través del hipocampo, es fuerte dentro de la capa polimórfica y molecular del giro dentado, así como las capas oriens, lucidum y radial de CA, excluyendo las capas piramidal y granular, donde la preferencia por el VGLUT-2 es notable (figura 11; Fremeau Jr et al., 2001; Kaneko et al., 2002b). Una escasa señal es identificada en forma de pequeños puntos sobre algunas células de la capa piramidal de CA1 y granular del giro dentado (Bellocchio et al., 1998; Kaneko et al., 2002; Balschun et al., 2010). El VGLUT2, se presenta únicamente en la capa piramidal de CA2 y granular del giro dentado.

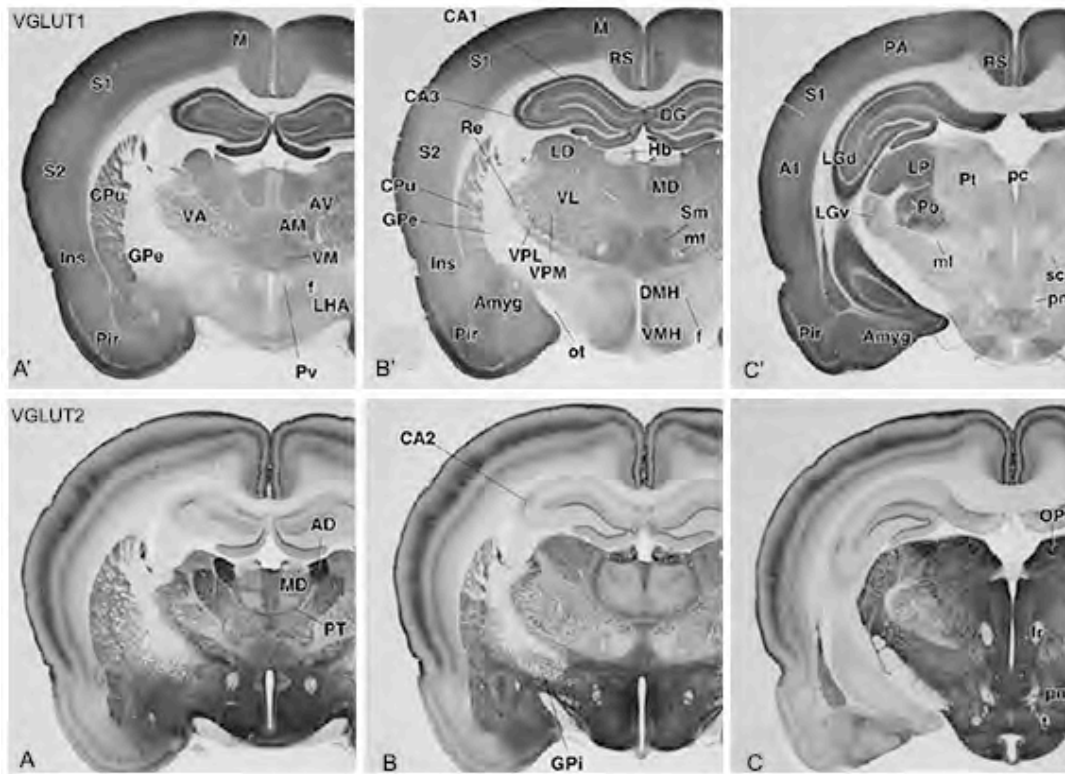


Figura 11. Distribución de la inmunoreactividad a VGLUT-1 y VGLUT-2, a través del hipocampo de la rata macho adulta. A'–C'. Señal inmunoreactiva de VGLUT-1; se nota que es enriquecida a través del hipocampo anterior y posterior, sobre las capas oriens y radial de CA y lucidum de CA3, así como polimórfica y molecular del GD. A-C. Señal inmunoreactiva de VGLUT-2; se observa en la capa piramidal de CA2/CA3 y granular del GD, a través del hipocampo. L-M, capa lacunosum-molecular; Lu, capa lucidum; Or, capa oriens; Py, capa piramidal; R, capa radial (Imagen modificada de Kaneko et al., 2002).

### 3.4. Papel y distribución de los astrocitos en el hipocampo

La coordinación de la comunicación sináptica entre neuronas, requiere de la interacción oportuna entre éstas y las células gliales. Los astrocitos, son un tipo particular de células gliales, relacionadas entre otras cosas con la síntesis y secreción de factores neurotróficos, procesos de reparación nerviosa, o el control de la señalización dada por calcio para la integración de las señales extracelulares. En el hipocampo, por ejemplo, se pueden observar incrementos súbitos en la inmunoreactividad de la proteína acídica fibrilar glial (GFAP), específica de filamentos intermedios de astrocitos, después de haber sufrido algún tipo de



lesión y daño neuronal (Markey et al., 2012). En el hipocampo de la rata adulta, las células inmunoreactivas a GFAP se distribuyen a través de todo el hipocampo, con algunas variaciones con respecto a la cantidad de células dentro de las distintas capas que conforman a cada una de las subregiones. El giro dentado es la subregión donde una mayor densidad de astrocitos son detectados; esto ocurre específicamente en la capa molecular, polimórfica e hilus. Dentro de CA también están presentes estas células, distribuidas sobre las capas oriens, así como lacunosum-molecular en CA1 y lucidum en CA3, mientras que la capa piramidal se encuentra desprovista de ellas (Ariza et al., 2011; Markey et al., 2012, figura 12).

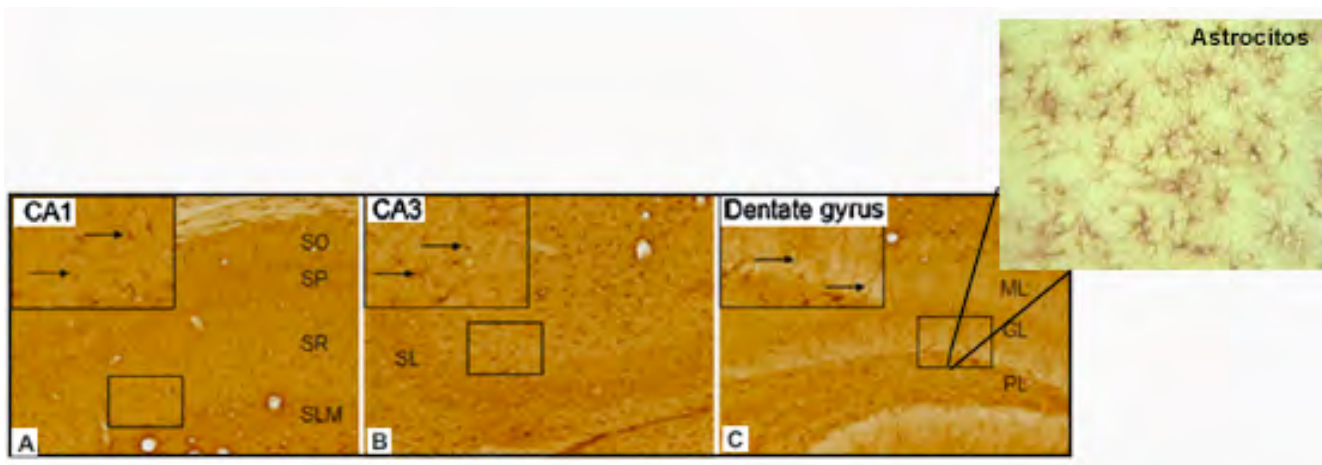


Figura 12. Distribución de los astrocitos en el hipocampo de rata macho adulta. Su distribución es prominente en las capas oriens y lacunosum-molecular en CA1 (A), así como oriens y lucidum en CA3 (B) y molecular, polimórfica y el hilus del giro dentado del hipocampo (C). Este tipo de células se caracteriza por presentar una forma estrellada (Magnificación en C). SO, estrato oriens; SP, estrato piramidal; SR, estrato radiatum; SLM, estrato lacunosum molecular; ML, capa molecular; GL, capa de células granulares; PL, capa de células polimórficas del GD (Imagen modificada de Markey et al., 2012).

### 3.5. Origen de la TRH presente en el hipocampo

Dentro del hipocampo, cantidades significativas de la TRH han sido detectadas por radioinmunoensayo dentro de CA3, con valores inferiores en CA1, GD e hilus; esta distribución es más prominente en la zona posterior del hipocampo. Es posible que parte del péptido tenga un origen intrínseco, sintetizado por algunas neuronas de CA3, un sitio donde se ha inmunolocalizado a la TRH (Kubek et al., 1986), o en neuronas del GD (Heuer et al., 2000; figura 13 D). Sin embargo, parece ser que el origen de la TRH presente en esta región es extrínseco en su mayoría, postulando a la vía aferente del fórnix como la fuente principal a través de la cuál la TRH llega al hipocampo. Contrario a lo esperado, lesiones en la vía perforante, una de las principales vías aferentes del hipocampo, no producen cambios en los niveles basales del péptido en esta región (Low et al., 1986). Botones sinápticos TRHérgicos se han detectado en la capa piramidal de CA1, CA3 y granular del GD del hipocampo posterior (Hökfelt et al 1989), lo cual coincide con la distribución del ARNm del receptor TRH-R1 y de la PPII (Heuer et al., 2000; figura 14).

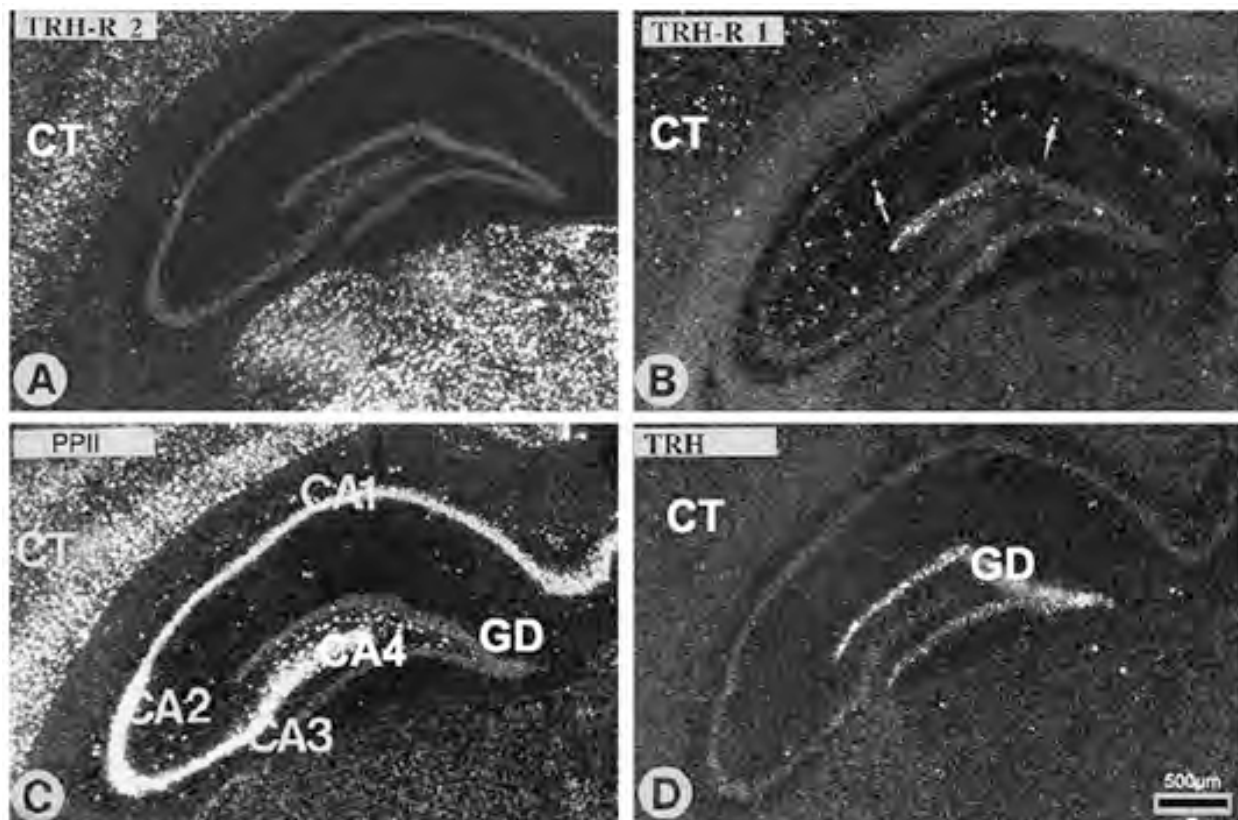


Figura 13. Distribución del ARNm de pro-TRH y sus elementos de respuesta en el hipocampo dorsal de la rata adulta en condición basal (sin estimulación). A. El ARNm del receptor TRH-R2 es prácticamente imperceptible. B. El ARNm del receptor TRH-R1, está presente en algunas células dispersas del hipocampo señaladas con flechas blancas. C. El ARNm de la PPII es abundante y diferencialmente expresado, registrando niveles más elevados en CA2, seguidos por los detectados en CA4, CA3 y CA1; en el GD la expresión es casi nula. D. El ARNm de la pro-TRH es sólo detectado en la capa granular del GD. CA, Cuerno de Ammon; CT, corteza cerebral; GD: giro dentado. Figura tomada de Heuer et al., 2000.

En condiciones basales, es decir, sin ningún tipo de tratamiento y/o estimulación, se ha detectado que en la parte ventral y posterior del hipocampo, la distribución del ARNm de la pro-TRH es escasa, sólo son detectadas algunas neuronas dispersas; el ARNm de TRH-R2 no parece expresarse y el de TRH-R1 está presente únicamente en el GD. La PPII, presenta niveles bajos de ARNm en esta zona, sin embargo su señal logra detectarse en CA3 (Heuer et al., 2000, figura 14). Aunado a estos datos, una elevada densidad de sitios de unión a la TRH ha sido detectada en la parte ventral del giro dentado (Manaker et al., 1985). La corteza cerebral y el hipocampo, son dos de las regiones que presentan niveles elevados de actividad de PPII en condición basal (Heuer et al., 2000; Vargas et al., 1987), pero su papel en esta región no ha sido demostrado.

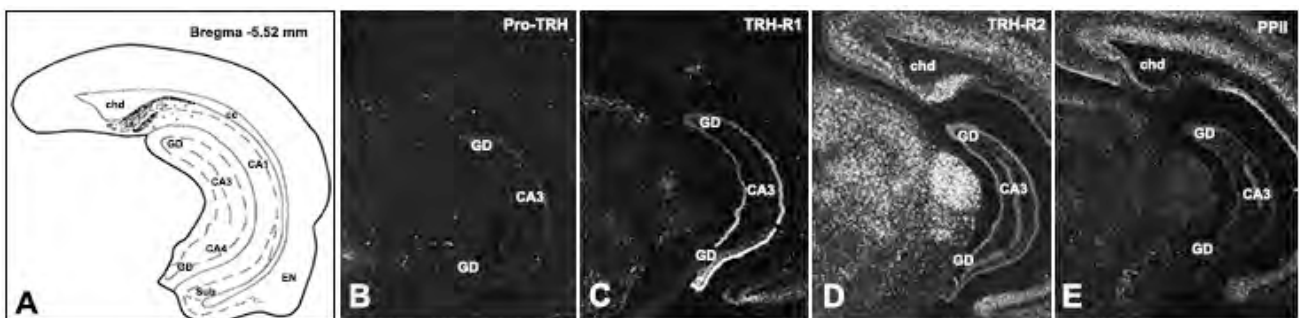


Figura 14. Distribución del ARNm de pro-TRH y sus elementos de respuesta en el hipocampo ventral y posterior de la rata adulta. A. Esquema de las sub regiones mostradas en los recuadros B-E. B. El ARNm de la pro-TRH no se observado en esta zona. C. El ARNm del receptor TRH-R1 está presente en el GD. D. El ARNm del receptor TRH-R2 es imperceptible en esta zona en condiciones basales. E. El ARNm de la PPII es sólo detectado en CA3. CA, Cuerno de Ammon; CT, corteza cerebral; GD: giro dentado (Heuer et al., 2000).

### 3.6. Papel de la TRH y de sus elementos de respuesta en el hipocampo, en modelos experimentales de la epilepsia y el aprendizaje

El *kindling* amigdalino, que consiste en la estimulación química o eléctrica subumbral repetitiva de la amígdala, provoca un aumento progresivo de varios comportamientos estereotípicos, que se pueden clasificar desde la etapa I hasta la V, cuando se detectan aspectos similares a algunas manifestaciones de la epilepsia. En la etapa II se produce una liberación rápida del TRH de las terminales pre-sinápticas, en regiones epileptogénicas que incluyen el hipocampo, y la corteza frontal. Esta activación de las neuronas TRHérgicas, viene acompañada por cambios a nivel transcripcional de su proteína precursora, como se observa en la figura 15, un aumento en la expresión del ARNm de la pro-TRH el cuál colocaliza con células positivas a la activación del gen Fos, esto ocurre de manera drástica al después de una estimulación eléctrica o *kindling*, y de sus elementos de respuesta, cambios que dependen en gran medida de la magnitud de la descarga, la etapa del *kindling* y la susceptibilidad del área bajo observación. Por ejemplo, durante la etapa II del *kindling*, los niveles de expresión del ARNm del receptor TRH-R1, incrementan en el giro dentado; los de TRH-R2 en CA2 y el giro dentado, y los de la PPII en todas las subregiones de CA. Mientras, en la etapa V, se hace evidente una disminución en la síntesis de TRH-R1 en CA2/CA3 y el GD; así como de TRH-R2 y PPII en CA2 (Rosen et al., 1992, 1992b; Kubek et al., 1993; Knoblach y Kubek, 1997, 1997b; de Gortari et al., 1995, 1998, 2006; Jaworska-Feil et al., 1999). Además, en la etapa II, la liberación de TRH viene acompañada de un incremento en la actividad de la PPII. Por el contrario, al establecerse la etapa V, la unión del péptido a sus receptores, así como la actividad de la PPII disminuyen en las áreas epileptogénicas (de Gortari et al., 1995, 2006; Knoblach y Kubek 1997).

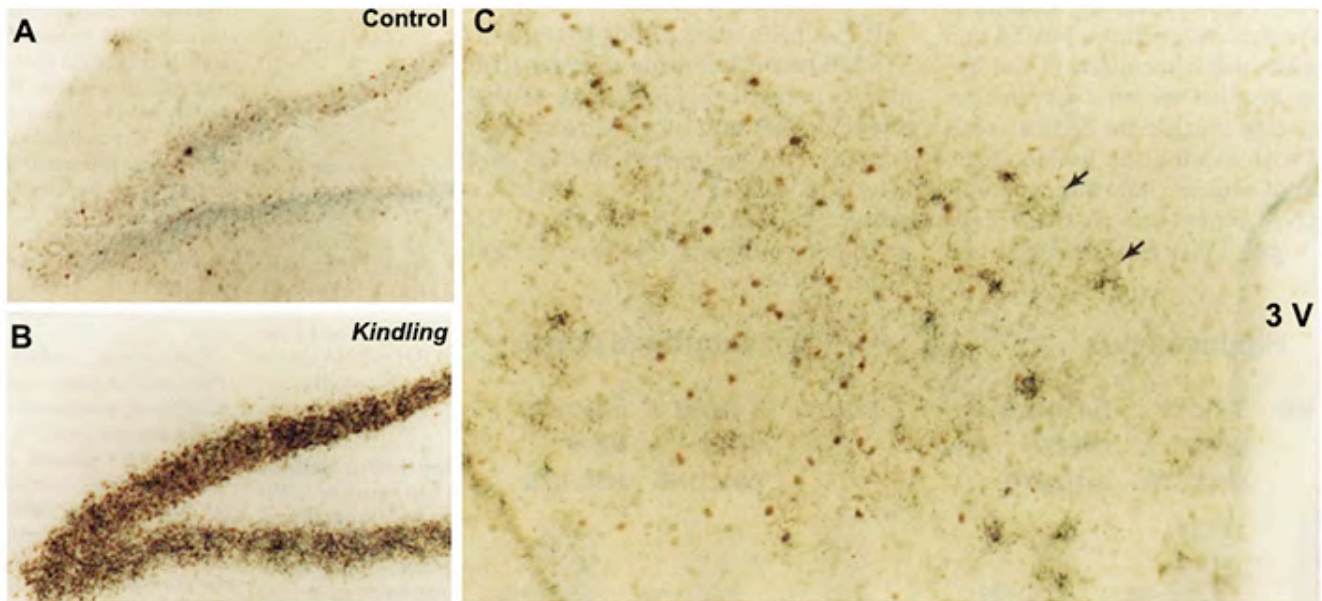


Figura 15. Colocalización del ARNm de la TRH y la inmunoreactividad del gen Fos después de la estimulación eléctrica por kindling amigdalino en el cerebro de rata adulta. A. Expresión del ARNm de la TRH (puntos negros) antes de la estimulación eléctrica en el giro dentado del hipocampo. B. Expresión del ARNm de la TRH y de Fos (círculos color café), después de la estimulación eléctrica en el giro dentado del hipocampo. C. Distribución del ARNm de la TRH en el PVN del hipotálamo y su colocalización con Fos, después de la estimulación eléctrica. Las flechas apuntan la acumulación de gránulos de ARNm de la TRH que reflejan células TRHérgicas (Imagen modificada de Rosen et al., 1992).

Estos datos muestran que durante el establecimiento del *kindling* los cambios cerebrales son acompañados de cambios en la comunicación TRHérgica, que pudieran tener un efecto neuroprotector y anti-epiléptico. A favor de esta idea, se ha demostrado que la administración icv de TRH en animales *kindleados* disminuye la frecuencia y duración del estímulo excitatorio después de la descarga eléctrica, incrementando el número de estimulaciones requeridas para provocar un daño e incrementando las propiedades anti-convulsivas de las drogas anti-epilépticas (Kubek et al., 1998).

Por otro lado, en animales sometidos a la prueba del laberinto de agua de Morris (MWM), se

activan circuitos neuronales implicados en el aprendizaje y la memoria espacial (Morris, 1984). Efectos a corto y largo plazo, como un incremento en la expresión de BDNF (una neurotrofina derivada del cerebro involucrada en la formación de botones sinápticos en las fibras musgosas de CA3), en el hipocampo posterior de los animales entrenados (Ramírez-Amaya et al., 2001) contribuyen potencialmente al aprendizaje. La activación de las neuronas TRHérgicas del hipocampo, debido específicamente al aprendizaje en la prueba del MWM, es sugerida por un aumento en la síntesis de los ARNm de TRH y TRH-R1, particularmente en CA3 y el giro dentado. Estos datos sugieren que durante esta prueba un incremento en la liberación del péptido pudiera contribuir a un aspecto, todavía desconocido, del aprendizaje (Aguilar-Valles et al., 2005, figura 16).

Consistentemente con esta idea, la administración de TRH justo antes de comenzar la prueba del MWM, disminuye el tiempo requerido por los animales para encontrar la plataforma sumergida (Olson et al., 1995). En conjunto estos datos apuntan a un papel de la TRH en el aprendizaje, y sugieren que uno de los sitios involucrados es el hipocampo.

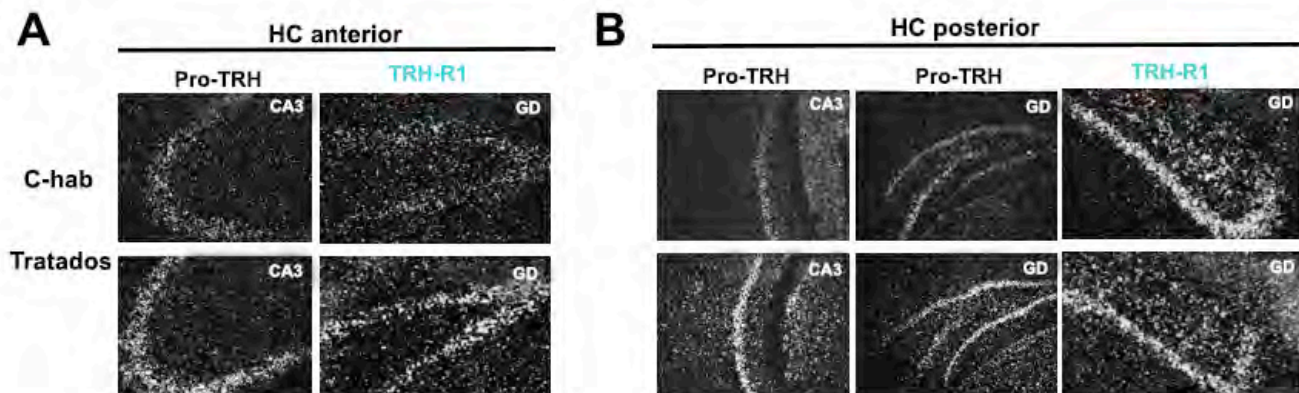


Figura 16. Expresión del ARNm de pro-TRH y TRH-R1 en el hipocampo de ratas adultas durante la prueba del laberinto de agua (Morris water maze). A. Efecto del entrenamiento sobre los niveles del ARNm de la pro-TRH en CA3 y de TRH-R1 en el GD del hipocampo anterior; animales control (C-hab; recuadros superiores) y entrenados (abajo). B. Efecto del entrenamiento sobre los niveles del ARNm de la pro-TRH en CA3 y GD; así como de TRH-R1 en el GD del hipocampo posterior; animales control (C-hab; recuadros superiores) y entrenados (abajo). (Imagen modificada de Aguilar-Valles et al., 2005)

### 3.7. La TRH modula la comunicación sináptica mediada por neurotransmisores clásicos en el hipocampo

Algunas de las acciones celulares de la TRH en el hipocampo son conocidas gracias a ensayos electrofisiológicos, mediante los cuales se logran obtener registros de las corrientes eléctricas generadas por una sola célula. Las respuestas celulares son variadas. Hoy sabemos que la TRH tiene la capacidad de incrementar la potenciación a largo plazo entre las sinapsis glutamatérgicas excitatorias del giro dentado y las células piramidales de CA3, un proceso celular considerado el soporte físico del aprendizaje en los animales (Ishihara et al., 1991). Además, la magnitud y duración de las señales excitatorias podría en parte estar controlada por la acción de la TRH la cual aumenta la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 y CA3, a través de la generación de potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs) dependientes del receptor NMDA del glutamato (Ishihara et al., 1991, 1992; Stocca y Nistri, 1994, 1995; Atzori y Nistri, 1996; Sakata-Haga et al., 2001; Ziegler et al., 2002; Fremeau Jr et al., 2004). Sin embargo, la TRH también reduce drásticamente el efecto estimulador de la aplicación intensa y repetida de una estimulación eléctrica del circuito aferente sobre la frecuencia de los EPSPs en CA3, un efecto reversible que controla el aumento de la excitabilidad eléctrica de estas células (Patiño et al., datos no publicados); estos efectos son probablemente atribuibles a la habilidad del TRH por controlar la transmisión GABAérgica, al producir una depresión reversible de los potenciales post-sinápticos inhibitorios (IPSPs), mediados por el receptor GABA<sub>A</sub> en las células piramidales de CA1 (Stocca y Nistri, 1996). Un mecanismo que explica algunos de los efectos de la TRH en el hipocampo es el incremento en la liberación del GABA de las interneuronas GABAérgicas de la capa radial en CA1, mediado aparentemente por el receptor TRH-R1, cuyo ARNm se co-expresa en las interneuronas GABAérgicas, responsables de formar las sinapsis inhibitorias con las células piramidales del hipocampo (Deng et al., 2006). Finalmente, se ha observado que el TRH puede inducir la liberación de acetilcolina en el hipocampo posterior (Giovannini et al., 1991; Prokai and Zharikova, 2002). Estos datos sugieren múltiples blancos y mecanismos de acción del TRH en el hipocampo.

### 3.8. Algunos elementos que contrastan la comunicación TRHérgica en el hipocampo con la neocorteza

La función hipocampal es íntimamente ligada a procesos cognitivos que ocurren en múltiples zonas de la corteza cerebral, lo que la hace una región de contraste para entender el significado de hallazgos en el hipocampo. La corteza cerebral, una región involucrada ampliamente en los procesos cognitivos y el procesamiento de la información somatosensorial, es otra de las regiones donde se han detectado niveles elevados del ARNm de la PPII. Sin embargo, en esta región hay un número bajo de células que expresan el ARNm de la TRH (Heuer et al., 2000), así como una baja densidad de sitios de unión a TRH (Manaker et al., 1985; Mantyh and Hunt, 1985). Una liberación basal de TRH ha sido detectada en estudios *in vitro* (Méndez et al., 1987). Muchas de las regiones corticales expresan TRH-R2, cuyos niveles de ARNm son altos en comparación con otras regiones del cerebro, mientras que la expresión de TRH-R1 parece muy discreta (O'Dowd et al., 2000; Heuer et al., 1998, 2000).

## 4. Fenotipificación de las células del hipocampo que expresan el ARNm de la PPII

### 4.1. En el hipocampo, algunas de las células que expresan a la PPII son neuronas GABAérgicas

En el hipocampo un análisis de la expresión de la PPII sugiere que buena parte de las células que la expresan pudieran ser células principales (Heuer et al., 2000; Vargas-Orihuela, 2013). Con el propósito de empezar a aclarar con seguridad el fenotipo de las células que expresan a la PPII en el hipocampo, hemos analizado la posibilidad de que las células PPII+ sean neuronas GABAérgicas. Nuestros datos resumidos en la gráfica de la figura 17, demuestran que una fracción notable de las neuronas GABAérgicas del hipocampo, co-expresan el ARNm de la PPII (Vargas-Orihuela, 2013, figura 18), corroborando por otro lado, el fenotipo neuronal de algunas de las células que expresan a la enzima PPII, el cual hasta entonces era desconocido.



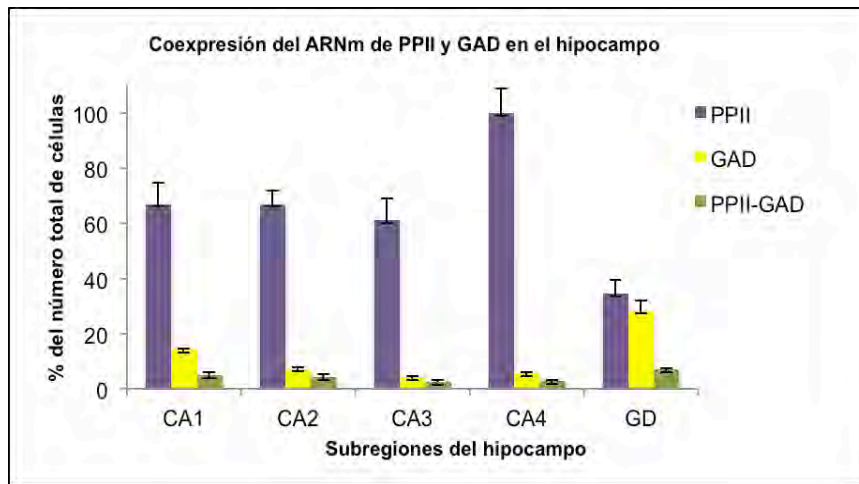


Figura 17. Los ARNm de GAD65 y PPII se coexpresan en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta. La cuantificación de las células GAD65<sup>+</sup> (barra amarilla), PPII<sup>+</sup> (barra morada) ó GAD65<sup>+</sup>/PPII<sup>+</sup> (barra verde), fue realizada en cada una de las sub-regiones del hipocampo. Las células PPII<sup>+</sup> fueron notablemente más abundantes que las células GAD65<sup>+</sup> en las regiones de CA, excepto en el giro dentado, donde la población de células GABAérgicas fue elevada con respecto a las demás zonas analizadas y equivalente a la población de células PPII<sup>+</sup>. El porcentaje de células GAD65<sup>+</sup>/PPII<sup>+</sup>, representa sólo 6.75% del total de células PPII del hipocampo, por lo que el fenotipo del otro 93.25% de la población, aún debe ser aclarado (Análisis de varianza de una sólo vía, ANOVA. \* = P < 0.05, esm ± 0.5, n=8). Vargas-Orihuela et al, 2013.

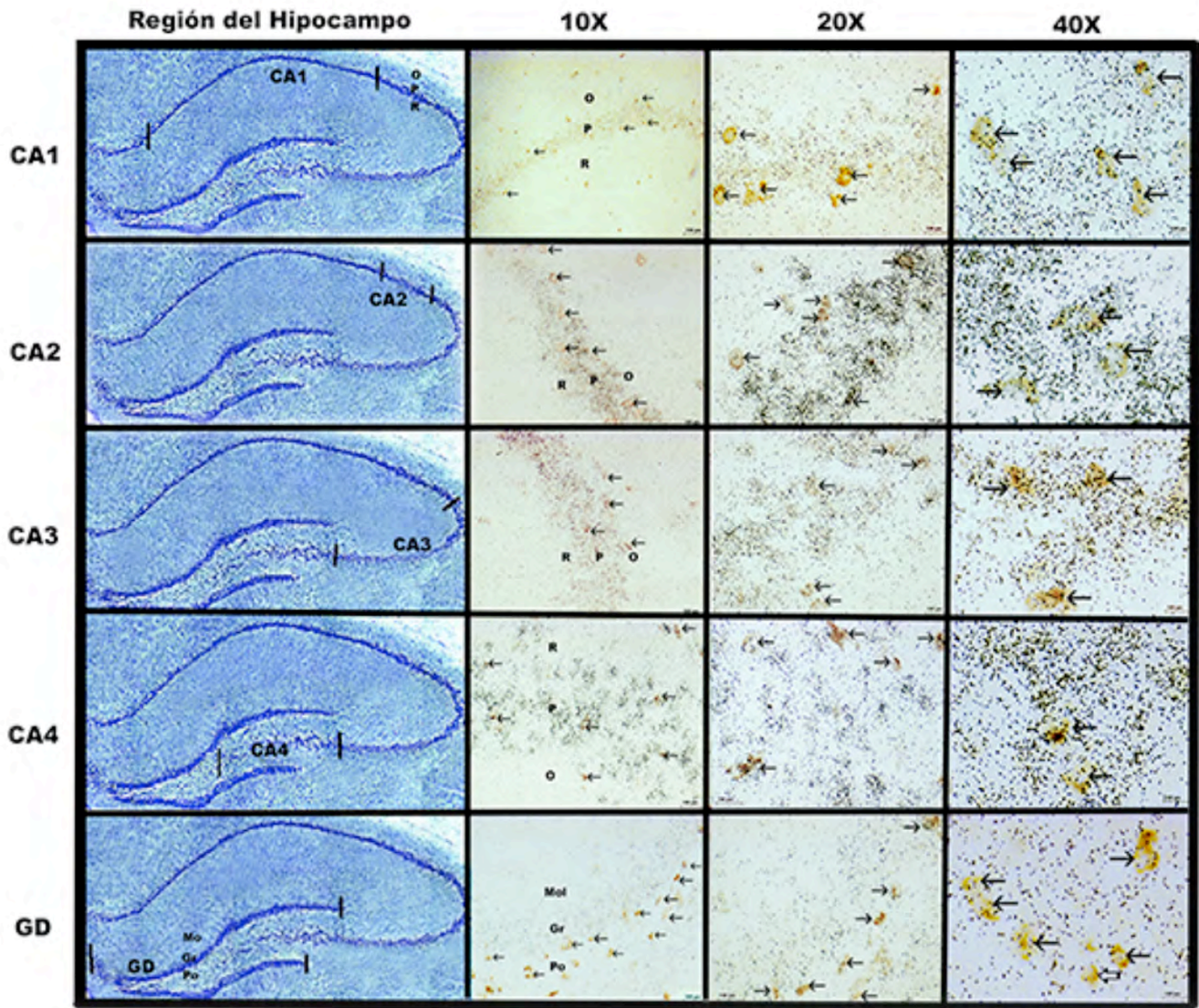


Figura 18. Una fracción importante de neuronas GABAérgicas co-expresa el ARNm de la PPII en el hipocampo de la rata macho adulta. En la columna de la izquierda, se muestran cortes coronales del hemisferio derecho del hipocampo, con tinción de violeta de cresilo delimitando el área que abarcó cada uno de los análisis llevados a cabo. Las otras columnas presentan imágenes tomadas en campo claro a distintos aumentos del microscopio (10X, 20X y 40X), señalando con flechas células GAD65<sup>+</sup>/PPII<sup>+</sup>, detectadas a través de un ensayo de doble hibridación *in situ*. CA, Cuerno de Ammon, GD, giro dentado; Gr, capa de células granulares; L-M, estrato lacunosum-molecular; Mo, capa de células moleculares; O, estrato oriens; P, estrato piramidal; Po, capa de células polimórficas; R, estrato radial. Tomado de Vargas-Orihuela, 2013.

## JUSTIFICACIÓN

Múltiples evidencias sugieren que la PPII es la enzima encargada de inactivar a la TRH en el medio extracelular del cerebro de los mamíferos, controlando la intensidad y duración de la acción de la TRH a proximidad de los sitios de liberación. Aún con esta información disponible, estamos lejos de entender con precisión la relevancia de la enzima en la fisiología cerebral. Queda la posibilidad de que la PPII tenga un efecto selectivo sobre la acción de la TRH, de acuerdo al contexto celular, tal como lo sugieren los datos en la adenohipófisis.

El hipocampo es una región cerebral que presenta altos niveles de actividad de la PPII, cuyos circuitos sinápticos responsables de transportar y decodificar la información del medio externo son bien entendidos, y en la cual se han logrado dilucidar con precisión un gran número de funciones de la TRH. Por lo tanto, aclarar el fenotipo de las células que expresan a la PPII en esta región podría contribuir al entendimiento del papel de la enzima y bajo que tipo de circunstancia modula la acción de la TRH.

Por el momento sabemos que algunas células que expresan a la PPII expresan a la GAD65, por lo que son probablemente neuronas GABAérgicas. Sin embargo, queda por aclarar el fenotipo del resto de las células PPII+. Tenemos que tomar en cuenta que en la eminencia media del hipotálamo la PPII se expresa en tanicitos, células emparentadas con los astrocitos, y que existe la posibilidad de algo similar en el hipocampo.

## **HIPÓTESIS**

Dado el papel conocido de la TRH en la modulación de la transmisión mediada por glutamato en el hipocampo, es postulado que el fenotipo predominante en el cual se expresa la PPII en esta región es glutamatérgico, y que las neuronas GABAérgicas que expresan a la ectoenzima corresponden sólo a un subtipo particular.

## **OBJETIVOS**

### **General**

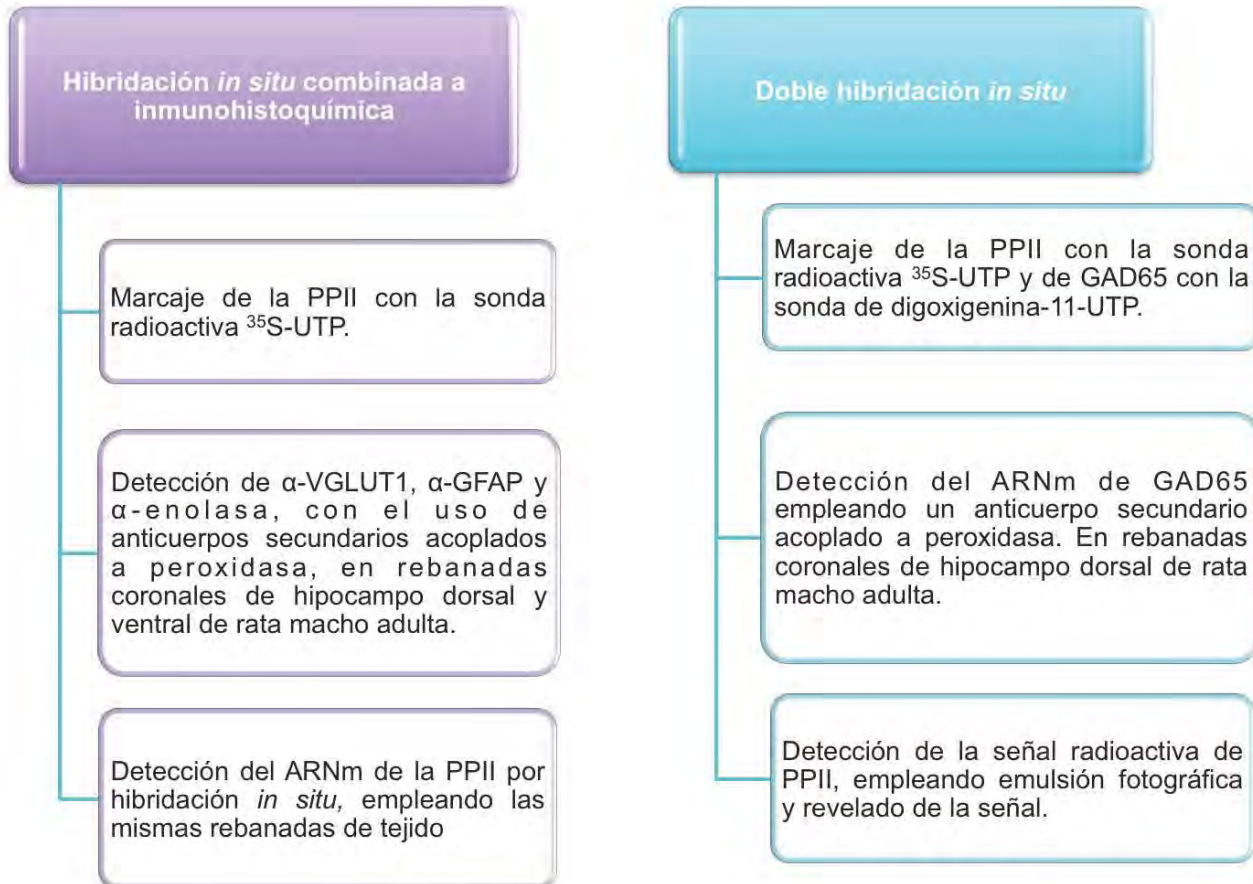
Describir el fenotipo de las células hipocámpales que expresan a la PPII

### **Particulares**

1. Precisar si el origen de las células que expresan a la PPII en esta región es neuronal o glial
2. Definir si las neuronas glutamatérgicas del hipocampo dorsal y ventral, expresan a la PPII
3. Corroborar si la colocalización de PPII y la enzima GAD observada en el hipocampo se extiende a la corteza cerebral, una región sensible también a la TRH.

## METODOLOGÍA

Los objetivos de este proyecto serán resueltos a través de las siguientes técnicas



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Material y H<sub>2</sub>O**

El material de vidrio que se utilizó para preparar y almacenar las soluciones se horneó a 180°C durante toda la noche. El material que no pudo ser horneado por ser sensible a las altas temperaturas fue esterilizado en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 min. Para preparar todas las soluciones de la hibridación *in situ*, así como para resuspender las sondas marcadas, se utilizó H<sub>2</sub>O desionizada en un miliQ (resistividad: 18M Ω/ cm) colectada en frascos horneados; posteriormente fue filtrada y esterilizada en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 min.

### **2. Animales**

Se emplearon 20 ratas machos de la cepa Wistar, adultas de aproximadamente 2 meses de edad, con un promedio de peso entre 350 - 400g, que fueron mantenidas en condiciones controladas de luz (de 7 a 19 hrs) y alimentadas *ad libitum*.

### **3. Obtención de cerebros por el método de perfusión cardiaca y congelamiento**

Los animales fueron inyectados vía intraperitoneal con una sobredosis de pentobarbital (63 mg/ml, solución inyectable marca Pet's pharma), lo cual equivale 600 µl por cada 250g de peso aproximadamente. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad y dentro de una campana de extracción.

La disección comenzó dejando el tórax expuesto para insertar el catéter con facilidad hacia la arteria aorta, atravesando el corazón, el catéter usado fue de 23G con aguja de 3.5 cm de largo. Al mismo tiempo la circulación del resto del cuerpo fue detenida colocando una pinza sobre la arteria aorta que pasa por la columna vertebral y que irriga de sangre la parte inferior del cuerpo del animal. Esta arteria se observa con mayor facilidad si se hace de lado el hígado del animal.

1. Se hicieron pasar a través de la arteria aorta 20 ml de PBS 1X (PBS 0.01M pH 7.4) que contenían 15,000 U/l de heparina-sulfato (marca Inhepar. Solución inyectable, presentación de 5,000 U/ml). Una vez que el flujo con la solución comenzó a pasar a través de la arteria, se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo para liberar la presión y permitir que la solución lavara perfectamente el cerebro. La heparina sirve para evitar la formación de coagulos de sangre.

Nota: la heparina una vez con el sello roto debe mantenerse en refrigeración, no se debe usar si la solución no es transparente o si contiene partículas en suspensión, de preferencia no usar si tiene más de 6 meses almacenada. Se usa una jeringa de 50 ml estéril para hacer pasar las soluciones. La jeringa se fija a una altura de un metro por encima del animal para obtener un flujo (vol/min) aprox. de 5 ml de solución por minuto. Se preparó una solución stock de PBS 10X pH 7.4, el cuál contenía NaCl 1.36 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  14.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  80 mM, KCl 26.8 mM, por cada litro de  $\text{H}_2\text{O}$ -MilliQ-synthesis.

2. Se suministraron 150 ml de paraformaldehído al 4% disuelto en PBS 1X

Nota: El paraformaldehído al 4% se preparó un día antes y fue almacenado a 4°C; sólo debe permanecer almacenado por un máximo de dos días para mejores resultados. Para su preparación se calentó el PBS 1X hasta que alcanzó los 65 °C (~5 minutos a potencia máxima en el microondas) y después se le agregaron 60µl de NaOH 10 M por cada 100 ml de PBS 1X. El frasco en el que se llevó a cabo la preparación del buffer fue llevado a la campana de extracción donde se le agregó el paraformaldehído que fue disuelto con la ayuda de un agitador. Para enfriar con rapidez la solución, el frasco fue colocado en una tarja que contenía hielo y agua. Al terminar el proceso de perfusión, el sistema fue lavado con  $\text{H}_2\text{O}$  grado MilliQ. Los desechos del paraformaldehído con la sangre de los animales fueron debidamente colectados en un bote y a su vez este fue depositado dentro de una bolsa de desechos biológicos (amarilla) y etiquetada.

3. Se disectó y se llevó a cabo la fijación del cerebro guardándolo dentro de un vial que contenía 20 ml de paraformaldehído 4%; los frascos fueron almacenados a 4°C durante 4 horas (máximo 12 horas).

4. Para su criopreservación los cerebros fueron cambiados a una solución de sucrosa al 20% en PBS 1X y almacenados a 4°C por 12 horas.

Nota: Una vez que se pusieron los cerebros en la solución de sucrosa al 20% (Marca J.T.

Baker, grado analítico), estos flotaron hacia la superficie de los viales. Una forma de saber el momento preciso en el cuál los cerebros estuvieron listos para su congelamiento fue monitoreando cuando estos cayeron al fondo del vial. Se necesitaron aproximadamente 20 ml de solución por cada frasco.

5. Los cerebros fueron congelados utilizando hielo seco pulverizado, el cual debía cubrirlos de manera homogénea por unos minutos, después fueron envueltos en papel parafilm y después en papel aluminio antes de ser almacenados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , donde permanecieron hasta su procesamiento. El proceso de obtención y congelamiento de los cerebros es esquematizado en la figura 19.

Estos experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología (UNAM).



Figura 19. Esquematización del proceso para obtención de los cerebros de rata macho adulta, así como su posterior tratamiento para poder mantenerlos almacenados hasta su uso.



#### 4. Inmunocitoquímica (ICC) en tejidos en flotación

Se llevaron a cabo ensayos de inmunohistoquímica para cada uno de los marcadores celulares para determinar las condiciones ideales de trabajo, así como las concentraciones de cada una de las soluciones y anticuerpos utilizados en cada ensayo y facilitar su uso en la técnica combinada de inmunohistoquímica con hibridación *in situ*.

Todos los pasos fueron llevados a cabo con agitación suave y una charola multipozo (marca Costar, Corning Incorporated con 24 pozos, con diámetro de 1.5 cm) fue requerida para colocar los tejidos que deben ir en flotación. Se usó aproximadamente 1 ml de cada solución y un total de 5 cortes por pozo. En cada paso se removió la solución anterior utilizando la punta de una pipeta de 200  $\mu$ l para absorber el líquido, cuidando el no maltratar los tejidos.

Se realizaron cortes coronales del cerebro al nivel del hipocampo dorsal (Bregma: entre – 2.8 y – 3.8, tentativo) de 18  $\mu$ m de grosor en un criostato (Modelo Bright, OTF) que se encontraba a -15 °C; los cerebros se dejaron estabilizarse a la temperatura del criostato por 2 horas dentro de la cámara del criostato antes de su manipulación.

Los cortes fueron colectados en PBS 1X, con la ayuda de punta de punta fina, previamente desinfectado con RNasa Zap (marca Ambion, The RNA company, No. Cat. 9780.9782) y remojando la punta en el PBS 1X cada vez que se recogía un corte nuevo.

Nota: se preparó una solución stock de PBS 10X especial para ICC, la cual contenía 90 g de NaCl por cada 500 ml de buffer fosfatos 0.2 M pH 7.4 y fue aforado hasta 1 L con H<sub>2</sub>O tipo MiliQ-synthesis

1. Los tejidos colectados fueron lavados 3 veces en PBS 1X, cada lavado con una duración de 10 minutos a temperatura ambiente (TA).
2. Fueron pre-tratados con una solución al 0.5% ( $\nu/\nu$ ) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de PBS 1X durante 15 minutos a T°A. El peróxido ayudó a eliminar la actividad peroxidasa endógena de los tejidos.
3. Fue agregada una solución al 0.5% de tritón X100 de PBS 1X durante 20 minutos a TA. Este tratamiento sirvió para mejorar la penetración de la sonda a los tejidos.

4. Los tejidos se dejaron pre-incubar por 30 minutos a TA en una solución de bloqueo que contenía una concentración al 0.5% de tritón X100, BSA al 1% en PBS 1X. Este paso elimina la interacción inespecífica de los anticuerpos con componentes de los tejidos.
5. Los tejidos se incubaron durante 2 días a 4 °C con una solución de dilución de anticuerpos que estaba compuesta de tritón X-100 al 0.1%, BSA al 1% y photo-flo 200 al 0.2% (marca Eastman de kodak Co. Al. No. Cat. 1464510) en la cual se diluyeron cada uno de los anticuerpos primarios de interés. La charola multi-pozo fue cubierta con papel carbón ya que algunos de los compuestos utilizados son sensibles a la luz. Para la determinación de las células de tipo neuronal, se utilizó una dilución 1:500 del anticuerpo policlonal de conejo contra la proteína enolasa específica de células neuronales (Rb X NSE, marca Millipore, No. Cat. AB951). La identificación de los astrocitos se realizó a través de la dilución 1:400 del anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína ácida fibrilar glial (Ms X GFAP, marca Millipore, No. Cat. MAB360). Y finalmente, para la identificación de las neuronas glutamatérgicas se utilizó una dilución 1:100 del anticuerpo policlonal de conejo contra el transportador vesicular de glutamato tipo 1 (Rb X VGLUT1, marca Invitrogen, No. Cat.48-2400 ).
6. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los tejidos fueron cambiados a una solución de PBS 1X y se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno a TA.
7. Después se incubaron los tejidos durante 2 horas TA con en el anticuerpo secundario diluido en solución de dilución de anticuerpos con la misma composición anteriormente mencionada. Para la detección del anticuerpo primario anti  $\alpha$ -NSE, fue empleada una dilución 1:5000 de un anticuerpo secundario dirigido contra inmunoglobulina de conejo y acoplado a peroxidasa (Gt X rabbit IgG-POD, marca Invitrogen, No. Cat. 6-21234). Para la detección del anticuerpo primario  $\alpha$ -VGLUT1 se empleó el mismo anticuerpo secundario pero con una dilución 1:1000. La detección del anti  $\alpha$ -GFAP fue realizada con una dilución 1:1000 de un anticuerpo secundario dirigido contra inmunoglobulina de ratón y acoplado a peroxidasa (Rb X mouse IgG-POD, marca Invitrogen, No. Cat. R-21455).
8. Para deshacernos del exceso de anticuerpo y de señales inespecíficas se realizaron 3 lavados en PBS 1X de 10 minutos cada uno a TA.
9. Antes de llevar a cabo la reacción de revelado del color, los tejidos fueron lavados en una solución al 0.05M de Tris HCl, pH 7.6 (marca SIGMA, life science. No. Cat. T6066) durante

10 minutos a TA.

10. La reacción de revelado de la señal que emite la peroxidasa se realizó en la oscuridad, agregando en una solución al 0.05M de Tris HCl, pH 7.6 el sustrato de la enzima, la diaminobenzidina (DAB; marca SIGMA, No. Cat. D-5637) en una concentración al 0.025% y  $H_2O_2$  al 0.0036% (marca SIGMA, No. Cat. H-1009, presentación en solución al 30% (v/v)). Los tejidos fueron mantenidos en estas condiciones a TA y sin agitación hasta que la señal apareció.

Nota: Fue necesario preparar un stock de DAB de 50 mg/ml en Tris HCl 0.05M, pH 7.6; el tubo donde se preparó fue inmediatamente protegido de la luz. Las pruebas de revelado de la reacción colorida en los tejidos se llevaron a cabo en el microscopio óptico, poniendo cada corte en una laminilla y observándola cada determinado tiempo bajo la luz del campo claro. Una vez que la señal adquirió un tono café intenso la reacción fue detenida en solución Tris HCl 0.05M, pH 7.6. Para inactivar el DAB que es altamente carcinogénico, fue necesario usar cloro en las zonas y objetos que estuvieron en contacto con la solución de revelado.

11. Por último los tejidos fueron montados en laminillas que tienen cargas positivas en la superficie y que evitan que los tejidos se desprendan con los lavados posteriores (marca Superfrost-Plus, Microscope Slides, Fisherbrand, No. Cat. 12-550-15). Se dejaron secar por alrededor de 15 minutos a TA y finalmente pasaron a través de un tren de lavados en etanol de 3 minutos cada uno, en el siguiente orden: 70%, 80%, 95%, 100%, 100% y dos veces en xilol, pasos necesarios para deshidratar los tejidos antes de ponerles el medio de montar (marca Cytoseal<sup>TM</sup> 60, de baja viscosidad, marca Richard-Allan Scientific) y colocarles el cubreobjetos para poder ser observados y analizados bajo el microscopio. El proceso de inmunohistoquímica y detección de la peroxidasa es esquematizado en la figura 20.

Obtención de tejidos en flotación para el empleo de anticuerpos y transcritos de cRNA, acoplados a peroxidasa y detectados por una reacción colorida

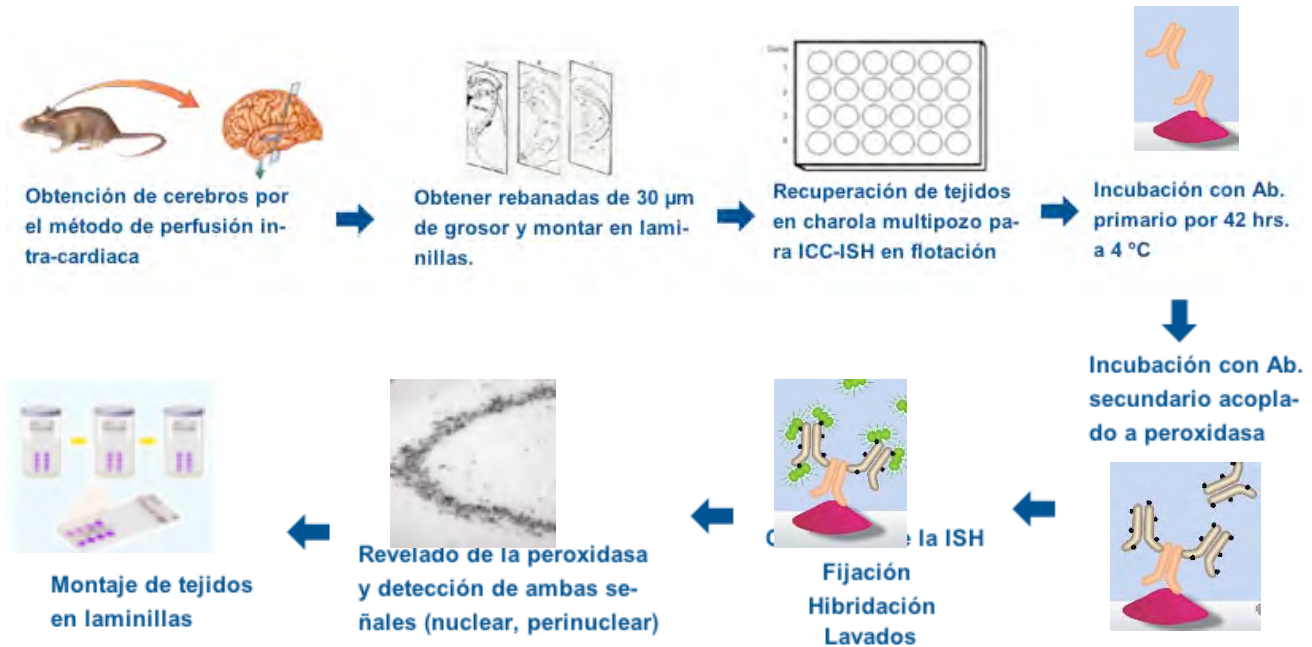


Figura 20. Esquematación del proceso metodológico de la inmunohistoquímica con tejidos en flotación, previamente fijados con paraformaldehído, empleando un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa alcalina

## 5. Transcripción *in vitro* de la PPII con el nucleótido $^{35}\text{S}$ $\alpha$ -UTP

Después de secar 125 µCi de uridin 5' trifosfato  $^{35}\text{S}$  (NEC 039H; actividad específica de 1250 Ci/mmol) durante 10 minutos en un evaporador (Savant), el nucleótido fue resuspendido en 8.5µl de mezcla de transcripción que contenía 0.7µl H<sub>2</sub>O-MilliQ, 2.4µl de buffer de transcripción 10X, 1.2µl de DTT 0.1M, 2.4µl de ribonucleótidos A,G,C 2.5 mM, 2.8µl de r-UTP 10µM, 0.7µl de inhibidor de ARNasas (40 U/µl). Se adicionó 1µg del plásmido pSPT19-PPII linearizado y previamente desnaturalizado por 5 minutos a una temperatura de 65°C. Finalmente 1µl de ARN polimerasa T7 (New England Biolabs Inc. 5,000 U/ml) fue agregada a la mezcla, la cuál se dejó incubar por 1 hora a 37°C; al termino de este tiempo, se adicionaron nuevamente 0.5µl de RNA polimerasa T7 y se incubó durante una hora más a 37°C; una vez transcurrido el tiempo, se agregaron al tubo de reacción 1µl de ARNt (10 mg/ml), 0.5µl de ADNasa Q y 1µl de inhibidor de ARNasas (40 U/µl), y se dejó la mezcla

incubando durante 45 minutos extras a 37°C. Al terminar el tiempo de incubación, se agregaron al tubo 40µl de ribostop (NaOAc 0.6 M pH4, EDTA 10 mM, SDS 1%) para detener la reacción y finalmente se recuperó el transcrito mediante extracción fenol: cloroformo. El ARNc obtenido fue resuspendido en 45µl de H<sub>2</sub>O-milliQ y 5µl de 0.1M de DTT. Se empleo 1µl del transcrito marcado para realizar la cuantificación por duplicado de la radioactividad incorporada a la sonda de PPII, en el contador de emisiones β.

## **6. Ensayo de inmunohistoquímica combinado con la técnica de hibridación *in situ*.**

La primera parte de los ensayos donde se combinaron las técnicas de inmunohistoquímica con tejidos en flotación y la hibridación *in situ* empleando una sonda de ARN complementario al ADNc de la PPII de rata (nucleótidos 129-773; Schauder et al., 1994, para de manera detallada la descripción del plásmido de PPII ver anexos), marcada con <sup>35</sup>S-UTP, comenzó siguiendo los mismos pasos empleados en la inmunohistoquímica sencilla (detallados en la sección 4 de Materiales y Métodos), con la única excepción de que el ensayo terminó una vez que los tejidos fueron montados en las laminillas y secados a temperatura ambiente.

### 6.1. Lavados anteriores a la hibridación

Ya con las laminillas dispuestas dentro de las jarras koplín (aproximadamente caben 14 laminillas por jarra) comenzó el tratamiento de los tejidos con una serie de soluciones que fueron agregadas en el siguiente orden:

- ✓ 1 lavado en PBS 1X de 3 minutos a TA con agitación.
- ✓ 1 lavado en solución al 0.3% de Tritón-X100 en PBS1X de 15 minutos a TA con agitación.
- ✓ 1 lavado en PBS 1X de 3 minutos a TA con agitación.
- ✓ Incubación con 1µg/ml de proteinasa K diluida en 10 ml de EDTA 0.5M y 10 ml de Tris 1M, pH 8.0, por cada 100 ml de H<sub>2</sub>O-milliQ, durante 30 minutos a 37°C con agitación.

- ✓ Fijación de los tejidos con paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 5 minutos a TA con agitación.
- ✓ 2 lavados en PBS 1X de 3 minutos cada uno a TA con agitación.
- ✓ Acetilación de los tejidos con ac. anhídrido acético/trietanolamina, por 10 minutos a TA con agitación. Para su preparación en fresco se agregaron 895µl de TTNH<sub>2</sub> y 250µl de Ac. Anhídrido acético por cada 100ml de solución y no se usó vórtex durante su preparación.
- ✓ 1 lavado en formamida al 50% en solución SSC 2X, durante 30 minutos a 37°C con agitación (Se preparó un stock de SSC 20X que contiene NaCl 3M y Citrato de Sodio 0.3M).

## 6.2. Preparación de la mezcla de hibridación

1ml de mezcla de hibridación, donde fue diluida la sonda marcada PPII <sup>35</sup>S α-UTP, es suficiente para hibridar un estimado de 20 laminillas y se elaboró con los reactivos a continuación descritos siguiendo el orden establecido:

- 0.1g de dextran sulfato
- 100µl de SSC 20X
- 10µl de solución Denhardt's 100X
- 250µl de Tris HCl 1M, pH 8
- 10µl de DTT 1M
- 55µl H<sub>2</sub>O-milliQ
- 25µl de ADN de esperma de salmón, previamente desnaturalizado a 65°C durante 5 minutos y colocado en hielo
- 500µl de formamida desionizada, previamente descongelada a 55°C y protegida de la luz en todo momento
- 50µl de duodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%

Todo se mezcló con la ayuda del vórtex y el tubo se mantuvo protegido de la luz. Es preferible que se mantenga el tubo a una temperatura de 55°C hasta el momento de ser usado.

### 6.3. Hibridación *in situ*

Cada laminilla fue hibridada con 50µl de buffer que contenía  $0.5 \times 10^6$  cpm's de sonda marcada con  $^{35}\text{S}$ - UTP (previamente desnaturalizada a 65°C durante 5 minutos y después puesta en hielo) y 0.3µl de DTT 1M. Los tejidos fueron cubiertos con papel Parafilm, cuidando no formar burbujas al colocarlo y colocadas en cámaras húmedas que en la tapa llevaron una cama de papel absorbente con SSC 1X/ formamida 1:1. Las cámaras fueron perfectamente selladas con cinta adhesiva para evitar que salga la humedad y colocadas en posición vertical en un horno a 55°C durante 12 horas.

### 6.4. Lavados posteriores a la hibridación

Una vez transcurrido el tiempo de hibridación, el Parafilm fue retirado de las laminillas sumergiéndolas una a una en solución SSC 1X y con la ayuda de una pinza. Ya libres del papel fueron colocadas de nuevo en las jarras koplín y se comenzó con los lavados post-hibridación

- ✓ Se realizó 1 lavado en solución SSC 1X de 15 minutos a TA con agitación.
- ✓ 1 pre-incubación en buffer para dilución de RNasa 1X (composición 29.22g de NaCl, 10 ml de Tris 1M pH 8, 2ml de EDTA 0.5M pH 8 para 1L de solución) por 5 minutos a 37°C con agitación.
- ✓ 1 incubación de 1 hora a 37°C con 50µg/ml de RNasa A diluida en buffer de dilución de RNasa 1X con agitación.
- ✓ 1 lavado en solución SSC 1X durante 15 minutos a 65°C con agitación
- ✓ 1 lavado en solución SSC 0.5X durante 15 minutos a 65°C con agitación
- ✓ 2 lavados en solución SSC 0.1X de 15 minutos cada uno a 65°C con agitación

- ✓ Finalmente los tejidos fueron deshidratados haciéndolos pasar por lavados de 3 minutos cada uno, en un tren de etanoles colocados en el siguiente orden: 70%, 80%, 95%, 100%, 100%. Las laminillas se dejaron secar a TA por 2 horas, cubriéndolas del polvo antes de ser emulsionadas.

#### 6.5. Detección de la radioactividad con emulsión fotográfica

Todo el proceso se llevó a cabo en completa oscuridad. Se preparó la emulsión fotográfica con una proporción 1:1 de agua desionizada dentro de un bañito de agua a 45°C.

- Se agregaron 20 ml de la emulsión fotográfica Kodak en una copa de emulsión que se encontraba sumergida en todo momento en un baño a 45°C, y se fueron metiendo cada una de las laminillas dentro de la copa, de forma cuidadosa para no producir la formación de burbujas.
- Se fueron colocando las laminillas emulsionadas en una rejilla para que se escurriera el exceso de emulsión y se dejaron secar durante 2 horas en completa oscuridad en una habitación con aire acondicionado a 17°C.
- Una vez secas, las laminillas fueron colocadas en cajas de hibridación a las cuáles se les colocó cinta adhesiva a los lados para evitar que se abrieran durante el tiempo de almacenamiento. Después, estas cajas fueron cubiertas con papel aluminio y guardadas en bolsas negras que contenían paquetes de sílica gel deshidratada.
- En una caja por separado fueron guardadas algunas laminillas para hacer las pruebas de revelado. Esta caja tenía una marca específica para poder distinguirla de la caja con laminillas experimentales.
- Las bolsas con las laminillas finalmente fueron almacenadas a 4°C durante 40 días aproximadamente, haciendo pruebas de revelado a partir de los 30 días cumplidos en algunas laminillas de prueba para detectar el tiempo óptimo de revelado de las laminillas experimentales simples y dobles.



## 6.6. Revelado de la emulsión fotográfica

El revelado de la emulsión se realizó haciendo lavados en las siguientes soluciones en completa oscuridad (todas las soluciones estuvieron a una temperatura de 13-14°C):

- 1 lavado en Revelador D19 (Kodak, 607g/3.8L) por 2 minutos y 40 segundos (el revelador se preparó en agua destilada a 52°C en la oscuridad).
  - 1 lavado en H<sub>2</sub>O- Ac. Acético al 2% por 40 segundos
  - 1 lavado en fijador GBX de 2 minutos
  - 1 lavado en fijador GBX de 2 min con luz roja de seguridad y 4 minutos con luz blanca
- Se dejaron las laminillas en H<sub>2</sub>O destilada por 15 minutos con movimientos suaves y se eliminó de la parte trasera de cada laminilla el exceso de emulsión con ayuda de una navaja, sin rayar las laminillas. Antes de montar los tejidos se deshidrataron realizando un tren de lavados de 3 minutos en etanol en el siguiente orden: 70%, 80%, 95%, 100% y 100%. Finalmente se hicieron 2 lavados en xilol de 3 minutos cada uno.

## 6.7. Contra-tinción de laminillas con violeta de cresilo

Una vez reveladas, las laminillas deben ser contra-teñidas usando el colorante violeta de cresilo, para marcar núcleos celulares en los tejidos. Para llevar a cabo esta tinción se realizaron los siguientes lavados, dentro de la campana de extracción:

- ✓ 2 lavados en xilol de 5 minutos cada uno
- ✓ 2 lavados en etanol al 100% de 5 minutos cada uno
- ✓ 1 lavado en etanol al 95% de 5 minutos
- ✓ 1 lavado en etanol al 70% de 5 minutos
- ✓ 1 lavado en agua destilado, se dejaron secando unos minutos a TA
- ✓ Incubación en violeta de cresilo al 1% por 5 minutos
- ✓ Se quitó el exceso de colorante con agua (de la llave) y se deshidrataron los tejidos:
- ✓ Se sumergieron en etanol al 70% por alrededor de 1 minuto
- ✓ Se sumergieron en etanol al 95% por alrededor de 1 minuto
- ✓ Se sumergieron en etanol al 100% por alrededor de 1 minuto

- ✓ Se sumergieron en etanol al 100% por alrededor de 1 minuto
- ✓ Finalmente se sumergieron en xilol de 2 a 3 veces y se les colocó un cubreobjetos.

## 7. Doble hibridación *in situ* con las sondas PPII <sup>35</sup>S α-UTP, GAD65 y VGLUT-1 digoxigenina 11 α-UTP

### 7.1. Transcripción *in vitro* de la sonda GAD65 y VGLUT1 con digoxigenina 11 α-UTP

A partir de la forma completa de la clona GAD65 (de ≈2000 pb) fueron sub-clonados en el vector pET-8c GAD65 los fragmentos correspondientes a los nucleótidos 315 a 944 y 944 a 1769 de GAD65. Ambos fragmentos fueron donados amablemente por la Dra. Sandra Petersen de la UCLA (Los Ángeles, CA, USA) y linearizados con la enzima XbaI (marca New England Biolabs Inc. 20,000 U/ml) para llevar a cabo la obtención del transcrito de ARN antisentido de GAD65-digoxigenina 11 α-UTP. Ambos fragmentos son complementarios por lo que no se sobrelapan entre sí (Erlander et al., 1991; Hays et al., 2002). Para la obtención del transcrito de ARN antisentido de VGLUT1-digoxigenina 11 α-UTP el plásmido VGLUT-1 fue linearizado con la enzima Sall (marca New England Biolabs Inc.).

La transcripción *in vitro* comenzó desnaturalizando 1 µg de cada uno de los fragmentos de ADNc de GAD65 y de VGLUT-1 durante 3 minutos a 65°C e inmediatamente después colocándolos en hielo. Posteriormente los transcritos fueron resuspendidos en 20 µl de mezcla de transcripción que contenía: 2 µl *buffer* de transcripción 10X, 1 µl de DTT 0.1M, una mezcla de 3 µl de ribonucleótidos A,G,C (10mM), 4 µl de rUTP frío 1 mM, 2 µl de digoxigenina 11 α-UTP 10 mM y 20 unidades de inhibidor de ARNasas 40U/µl. Para ambas reacciones con GAD65 se agregaron 30 unidades de ARN polimerasa T3 (marca Roche, 5000 u/ml), para la reacción con VGLUT-1 se adicionaron 30 unidades de ARN polimerasa T7 (marca New England Biolabs Inc. 50,000 U/ml) y a cada reacción se le agregó H<sub>2</sub>O-ISH hasta completar el volumen final. La reacción se llevó a cabo a 37°C por 1 hora, y transcurrido el tiempo de incubación se adicionaron nuevamente 30 unidades de la correspondiente ARN polimerasa. Transcurrida 1 hora a 37°C, se adicionaron 10 unidades de ADNasa I (10 U/µl), 20 unidades de inhibidor de ARNasas (40 U/µl), 1 µl de ARNt 10 µg/ml y los tubos de reacción se dejaron incubando a 37°C por otros 45 minutos finales. Para detener

la reacción se agregó a cada tubo DTT 20 mM hasta completar un volumen final de 100  $\mu$ l. La precipitación de los transcritos marcados se llevó a cabo adicionando 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío; ambos tubos se dejaron por 12 horas a -20°C. La recuperación de los transcritos se realizó centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm's a 4°C; se aspiró el sobrenadante y se dejaron secar las pastillas por 5 minutos a T°A. Las sondas fueron resuspendidas en 45  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-ISH + 5  $\mu$ l de DTT 0.1 M. Se hizo una segunda precipitación adicionando nuevamente 1/25 de volumen de NaCl 5 M + 3 volúmenes de etanol absoluto frío; los tubos se dejaron precipitando por al menos 2 horas a -70°C; la recuperación de los transcritos se realizó por centrifugación de 30 minutos a 13,500 rpm's a 4°C; se aspiró el sobrenadante y se dejaron secar las pastilla por 5 minutos a T°A. Finalmente, las sondas fueron resuspendidas en 45  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-ISH + 5  $\mu$ l de DTT 0.1 M y almacenadas a -70°C hasta su uso. Se tomó una alícuota de 1 $\mu$ l de cada una de las sondas de GAD65 y de la sonda VGLUT-1 para llevar a cabo la determinación de la eficiencia de incorporación de la digoxigenina 11  $\alpha$ -UTP al transcrito (consultar el anexo 3).

Debido a que la longitud de cada uno de estos transcritos es grande y esto podría afectar su penetración a los tejidos durante la hibridación *in situ*, se realizó un acortamiento de cada sonda por medio de una hidrólisis alcalina controlada y se obtuvieron pequeños fragmentos de 100 pb de longitud en promedio, para ver de manera detallada como se llevó a cabo este procedimiento consultar el anexo 4.

## 7.2. Tratamiento de pre- hibridación de los tejidos perfundidos

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

- 1 lavado en PBS 1X por 3 minutos a TA
- 1 lavado en tritón X-100 0.3%/ PBS 1X por 15 minutos a T°A
- 1 lavado en PBS 1X por 3 minutos a TA
- Incubación con 1 $\mu$ g/ml de proteinasa K preparada en fresco (EDTA 0.5 M pH 8, Tris 1 M pH 8, H<sub>2</sub>O-ISH) por 30 minutos a 37°C
- 1 lavado en paraformaldehído al 4%/ PBS 1X por 5 minutos a TA
- 2 lavados en PBS 1X de 3 minutos cada uno a TA

- Acetilación con ácido anhídrido acético 0.25%/trietanolamina (0.1M)/ SSC 4X (preparar en fresco y agregar el ácido acético anhidro 1 minuto antes de usar, proteger de la luz) por 10 minutos a TA
- 1 lavado en formamida al 50%/ SSC 2X por 30 minutos a 37°C. Mientras se van hibridando las laminillas se mantienen en esta solución.

### 7.3. *Buffer* de hibridación

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

100µl de SSC 20X, 10 µl de Denhardt's 100X, 250 µl de Tris HCl 1 M pH 8, 10 µl de DTT 1 M, 55 µl de H<sub>2</sub>O-ISH, 0.1 g de dextran sulfato, 25 µl de ADNss (previamente desnaturalizado a 65°C por 3 minutos y colocado inmediatamente en hielo), 500 µl de formamida ultrapura desionizada y 50 µl de SDS 10%; se mezcló todo perfectamente con vórtex y el tubo de reacción se mantuvo protegido de la luz (se guardó en un horno a 55°C durante unos minutos para facilitar que se disolviera el dextran).

### 7.4. Doble hibridación *in situ*

Cada laminilla con cuatro cortes coronales se hibridó con una mezcla de hibridación que contenía  $0.5 \times 10^6$  cpm's de sonda marcada con <sup>35</sup>S- UTP, 3 µl de sonda GAD65 628 pb, GAD65 824 pb; y VGLUT-1 digoxigenina 11 α-UTP (≈20ng de cada sonda), 0.75µl de DTT 1M y *buffer* de hibridación hasta completar un volumen final de 50 µl. Los transcritos fueron previamente desnaturalizados por 5 minutos a 65°C y colocados inmediatamente en hielo. La mezcla de hibridación se colocó sobre los tejidos y con la ayuda de una pinza se cubrieron con un Parafilm del tamaño exacto que abarcaban los cortes en cada laminilla. Con ayuda del Parafilm se distribuyó de manera uniforme la mezcla sobre los tejidos, evitando la formación de burbujas. Las laminillas se colocaron dentro de cámaras húmedas que contenían en la tapa una cama de papel absorbente con SSC 1X/ formamida 1:1. Fueron perfectamente selladas con cinta adhesiva alrededor de las cámaras y colocadas en posición vertical en un horno a 55°C durante 12 horas.

### 7.5. Lavados post- hibridación y detección de la digoxigenina

Se sacaron las cajas húmedas del horno y se retiró cuidadosamente el Parafilm a cada una de las laminillas, sumergiéndolas en *buffer* SSC 1X a Tª (SSC 20X, NaCl 3 M y Citrato de Sodio 0.3 M, aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O-ISH) y la ayuda de una pinza. Las laminillas fueron colocadas en jarras *koplin* y se realizaron una serie de lavados para eliminar el pegado inespecífico de las sondas. Todos los pasos fueron con agitación:

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

A cada laminilla se le agregó una dilución 1:50 de anti-digoxigenina acoplado a peroxidasa alcalina (anti-dig POD fab fragment. Marca: Enzo, Boehringer. No. Cat. 84127927) en *buffer* de dilución de anticuerpo (SSC 2X, tritón X100 al 0.3%, BSA al 1%). Se cubrieron los tejidos con Parafilm nuevamente y las laminillas se colocaron en cámaras húmedas que contenían en la tapa una cama de papel absorbente con H<sub>2</sub>O-ISH. Fueron perfectamente selladas con cinta adhesiva colocada alrededor de las cámaras y colocadas a 4°C por 42 horas en posición vertical.

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

- 2 lavados en *buffer* A de 10 minutos cada uno a TA con agitación
- 2 lavados en *buffer* Tris 0.05 M pH 7.6 de 5 minutos cada uno a TA con agitación
- Revelado de la actividad peroxidasa usando como sustrato 3,3'-diaminobencidina (DAB) al 0.025% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.0036% en Tris 0.05 M pH 7.6 a 4°C (se preparó un *stock*

con 0.025 g de DAB en 500µl de Tris 0.05 M pH 7.6; el revelado se llevó a cabo en aproximadamente 5 horas)

- 1 lavado en *buffer* Tris HCl 0.05 M pH 7.6 para detener la reacción

Las laminillas se dejaron secar de 2-3 horas a TA antes de emulsionar con la película fotográfica (marca NTB Kodak). La emulsificación y el revelado de las laminillas se llevó a cabo tal como se especifica en los puntos 6.5 y 6.6 de métodos.

## 8. Análisis de las imágenes

Las secciones fueron visualizadas con un microscopio (Axioscop, Carl Zeiss; Jena, Alemania) bajo campo claro y oscuro y una cámara de video (ExwaveHAD, Sony). Las interpretaciones de los resultados que se presentan a continuación fueron obtenidas a partir de las observaciones de 4 cortes de cerebro por cada animal. En total fueron analizados 3 animales distintos. Para contar los perfiles celulares, las imágenes obtenidas bajo iluminación en campo claro fueron analizadas con el software Mercator (Explora Nova, v.1.88a), esencialmente como describe (Sánchez et al., 2007). Para cuantificar la señal del ARNm+ de GAD65 y de PPII del hipocampo, manualmente se delimitó con la ayuda del *mouse* de la computadora el contorno de la zona a cuantificar sobre imágenes en campo oscuro en 5X, sobre el área delimitada se creó una cuadrícula y las cuantificaciones se realizaron en cada uno de los recuadros que abarcaba. En la corteza, recuadros idénticos con un área de 671388 µm (dada por el programa) fueron delimitados sobre imágenes en campo oscuro en 5X. La cuantificación de secciones contiguas se realizó desplazando el cuadro de manera motorizada (en 40X). Cada perfil GAD o VGLUT fue considerado ARNm+ PPII, si contenía al menos 20 granos de plata dentro de un espacio de 1 µm y se le daba una marca distintiva. Las células sólo ARNm+ GAD o VGLUT también fueron marcadas y contabilizadas. Las marcas en cada recuadro de una cuadrícula fueron registrados por la computadora y el número de células totales cuantificado. Las imágenes resultantes de cada región fueron almacenadas. Los perfiles marcados con ICC fueron tomados como positivos si el color café resultado de la reacción colorida de la peroxidasa unida a su sustrato era fácilmente visible y distinguida del fondo (*background*). Para las doblemente marcadas, las células fueron tomadas como doblemente positivas si los granos de plata de la PPII coincidían con el color

o estaban en una muy cercana proximidad.

Para ambas capas de la corteza, superficiales e internas, así como en el hipocampo, las muestras de un número total de perfiles positivos a PPII y o GAD ARNm fueron tomados en ambos hemisferios y promediados. Para cada animal, fue obtenida la media de dos valores en distintos niveles antero-posterior; 4 animales fueron analizados; los datos son media  $\pm$  S.D.

## RESULTADOS

### 1. Las células astrogliales del hipocampo de la rata adulta no expresan el ARNm de la PPII

De acuerdo a datos publicados por Bauer et al., 1990, Cruz et al., 1991, en cultivos celulares de cerebro de rata adulta, la síntesis del ARNm de la PPII ocurre en células neuronales y no en células de tipo glial; sin embargo, se ha observado una excepción en los tanicitos de las paredes basal e infralaterales de la eminencia media del hipotálamo, los cuales sintetizan el ARNm de la PPII (Sánchez et al., 2009). Se decidió por lo tanto analizar si los astrocitos (células emparentadas con los tanicitos) expresan a la PPII en el hipocampo.

#### 1.1. Distribución de las células astro-gliales en el hipocampo de la rata macho adulta

La identificación de los astrocitos del hipocampo se llevó a cabo empleando la técnica de inmunohistoquímica sobre cortes coronales del cerebros de ratas macho adultas, empleando como anticuerpo primario el marcador específico de células astrogliales, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lo que nos permitió identificar de manera precisa los sitios de localización de este tipo particular de células gliales dentro del hipocampo (figura 21.A); como un control de este ensayo en cortes de la misma región, realizamos todos los pasos de la técnica, exceptuando el paso de incubación con anticuerpo primario (anti-GFAP) y no se obtuvo ninguna señal, como se observa en la imagen B de la figura 21, en ella se señala cómo el hilus del hipocampo, una zona densamente poblada por astrocitos, se encuentra desprovisto de estas células en estos cortes. Observamos que esta región contiene una cantidad muy importante de astroglia a través de todas las subregiones que conforman al hipocampo; además, con excepción de lo que ocurre en CA4, la distribución dentro de las capas que constituyen a cada subregión, es heterogénea. De manera notable, una mayor densidad de astrocitos se encuentran dentro de la capa oriens de CA1 a CA3, el estrato lacunosum-molecular de CA1, así como la región polimórfica del giro dentado e hilus; en estas subregiones, las capas piramidal y granular están desprovistas de señal. Hacia la parte más externa de CA3, la cual también es conocida como CA4, la distribución se vuelve homogénea, abarcando todas las capas de CA. Una magnificación de la imagen en 1.A, nos permite apreciar la peculiar forma estrellada que caracteriza a este tipo de células (figura



21.D). Estos ensayos preliminares nos permitieron corroborar la especificidad del marcador empleado, ya que nuestros resultados coinciden con los reportados previamente por Markey et al., 2012. Además, se pudo determinar las condiciones idóneas para la detección del anti-GFAP, a través de la reacción colorida de la peroxidasa acoplada a un anticuerpo secundario, lo que nos permitió reproducir de manera consistente estos resultados en los ensayos subsecuentes.

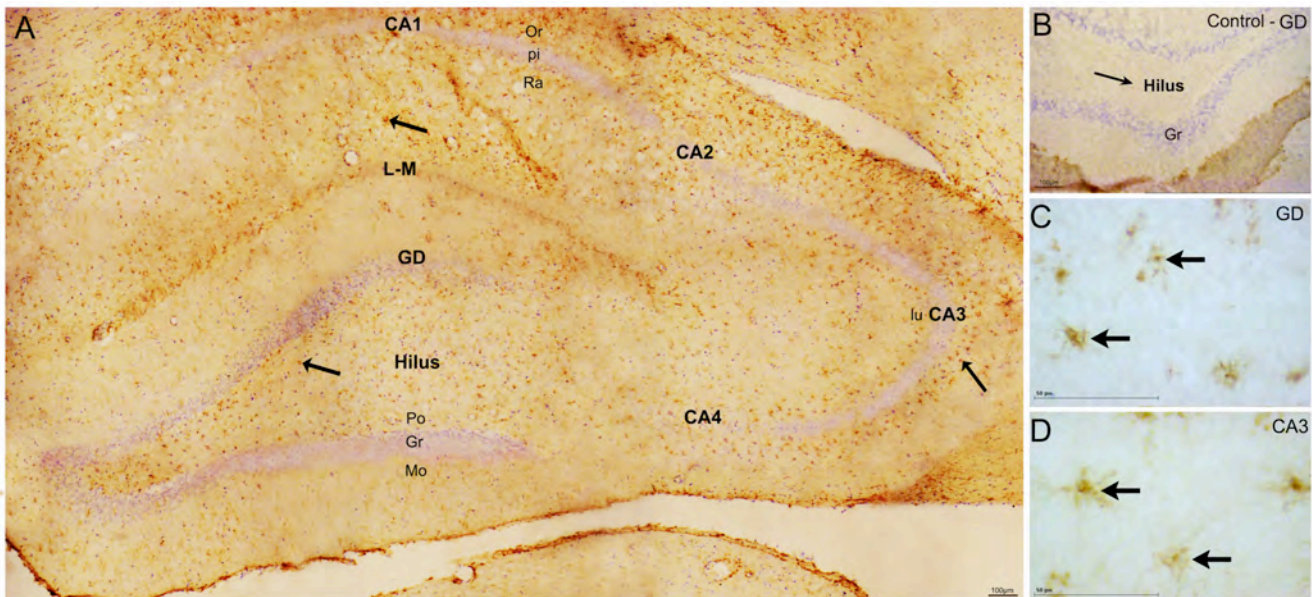


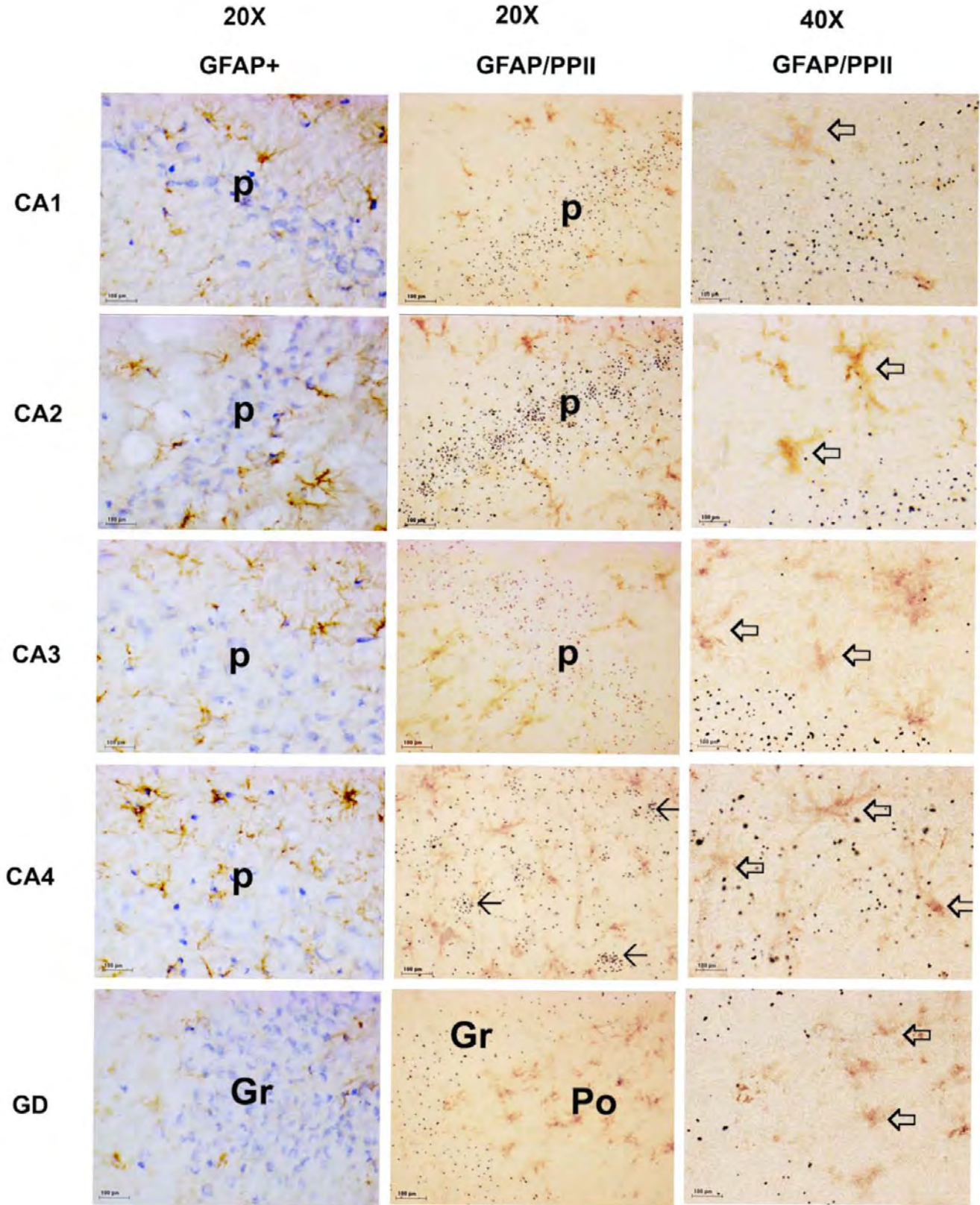
Figura 21. Identificación de las células astrocíticas en el hipocampo de la rata macho adulta, a través de la detección de la proteína anti-GFAP. A. Mapa del hemisferio derecho del hipocampo, formada a partir de 20 fotografías tomadas en 5X con el microscopio óptico. Aquí se observa como la distribución es heterogénea a través de las subregiones hipocampales de CA, con mayor número de células en la capa oriens de CA1-CA3 y lacunosum-molecular de CA1, mientras que la capa piramidal está desprovista de señal; en la capa polimórfica e hilus del giro dentado la distribución de astrocitos es prominente, mientras que no se observa señal en la capa granular. Las capas granular y piramidal fueron identificadas gracias a la contra-tinción con violeta de cresilo (azul). Las flechas señalan algunas de las células que fueron positivas a la reacción de anti-GFAP. B. Corte del hipocampo dorsal sin anti-GFAP, todos los demás pasos fueron hechos. Se señala con una flecha el hilus del GD por ser una zona con alta densidad de astrocitos como se puede observar en A y como está desprovista de señal GFAP. C y D. Magnificación (40X) donde la morfología estrellada característica de estas células es apreciada en GD y CA3, respectivamente. Or, capa oriens; pi, piramidal; Ra, radial; L-M, lacunosum-molecular de CA1; Mo, capa molecular; Gr, capa granular; Po, capa polimórfica (La imagen en B fue tomada de Paxinos y Watson, 1986).

## 1.2. Detección del ARNm de la PPII del hipocampo en tejidos marcados previamente con anti-GFAP

Los resultados anteriores nos permitieron determinar de manera preliminar que la distribución de los astrocitos en la mayoría de las subregiones hipocámpales no coincidía con los sitios de expresión del ARNm de la PPII, previamente reportados por el grupo de Heuer et al., 2000, confirmados por nosotros (Vargas-Orihuela, 2013). Sin embargo, un análisis detallado de las células en CA4 fue requerido para definir si existía colocalización del ARNm de la PPII y los astrocitos que abarcan todas las capas de esta zona.

Los ensayos de inmunohistoquímica combinados con la técnica de hibridación *in situ*, para la detección del ARNm de la PPII revelaron que no existe colocalización del mensajero en este tipo celular en ninguna de las subregiones del hipocampo dorsal analizadas. Los resultados de estas observaciones fueron similares en el hipocampo ventral (imágenes no mostradas). En CA4, a pesar de estar presentes ambas poblaciones celulares, astrocitos y células PPII<sup>+</sup>, dentro de la capa piramidal, éstas parecen no mezclarse o sobrelaparse; manteniendo el mismo patrón de no-colocalización, observado en el resto del hipocampo (figura 22).

Figura 22. Detección del ARNm de la PPII en tejidos previamente marcados con la proteína anti-GFAP en el hipocampo de la rata macho adulta. En la columna 1, de izquierda a derecha, se muestran imágenes con tejidos que fueron marcados con la proteína anti-GFAP y contra-teñidos con violeta de cresilo. En estas imágenes podemos identificar claramente las capas de células principales del hipocampo (piramidal, granular) y comparar con la distribución de los astrocitos en cada subregión. En la segunda columna, se presentan imágenes del ensayo de inmunohistoquímica combinada a hibridación *in situ*, en donde la expresión del ARNm de la PPII se observa en forma de granos de plata sobre las capas de células principales del hipocampo. Con flechas negras se señalan algunas células PPII<sup>+</sup> localizadas en CA4, las cuales no colocalizan con las células gliales de esta subregión. Por último, en la tercera columna se presentan imágenes adquiridas en el máximo aumento, para mostrar que los astrocitos presentes en cada subregión del hipocampo (señalados con flechas vacías), no parecen co-expresar el ARNm de la PPII. Gr, capa granular del giro dentado; p, capa piramidal; Po, capa polimórfica del giro dentado.



## **2. Las células de tipo neuronal del hipocampo de la rata adulta expresan el ARNm de la PPII**

La ausencia de expresión de PPII en astrocitos en el hipocampo es consistente con una expresión específicamente en neuronas. Sin embargo, existe la posibilidad alternativa de su expresión en otro tipo glial (microglía por ejemplo). Para resolver esta duda se decidió comprobar que las células PPII<sup>+</sup> son efectivamente neuronas.

### **2.1. Distribución de la proteína enolasa específica de neuronas en el hipocampo de la rata macho adulta**

La detección de la enzima enolasa (la isoforma específica de neuronas), responsable de llevar a cabo la síntesis del fosfoenolpiruvato durante la glucólisis, fue utilizada como marcador específico de las células neuronales del cerebro de la rata macho adulta. A través de la reacción colorida de la peroxidasa, acoplada a un anticuerpo secundario, pudimos observar que su distribución dentro del hipocampo es muy amplia (figura 23.A). La señal pudo ser identificada de manera homogénea, en todas las subregiones que conforman al hipocampo, a lo largo de todas las capas que dan lugar a cada una de ellas y son señaladas con flechas en las imágenes B-F de la figura 23. Controles de estos ensayos evidenciaron que sin el anticuerpo primario en los tejidos no se observa esta señal (Figura 23. G-I).

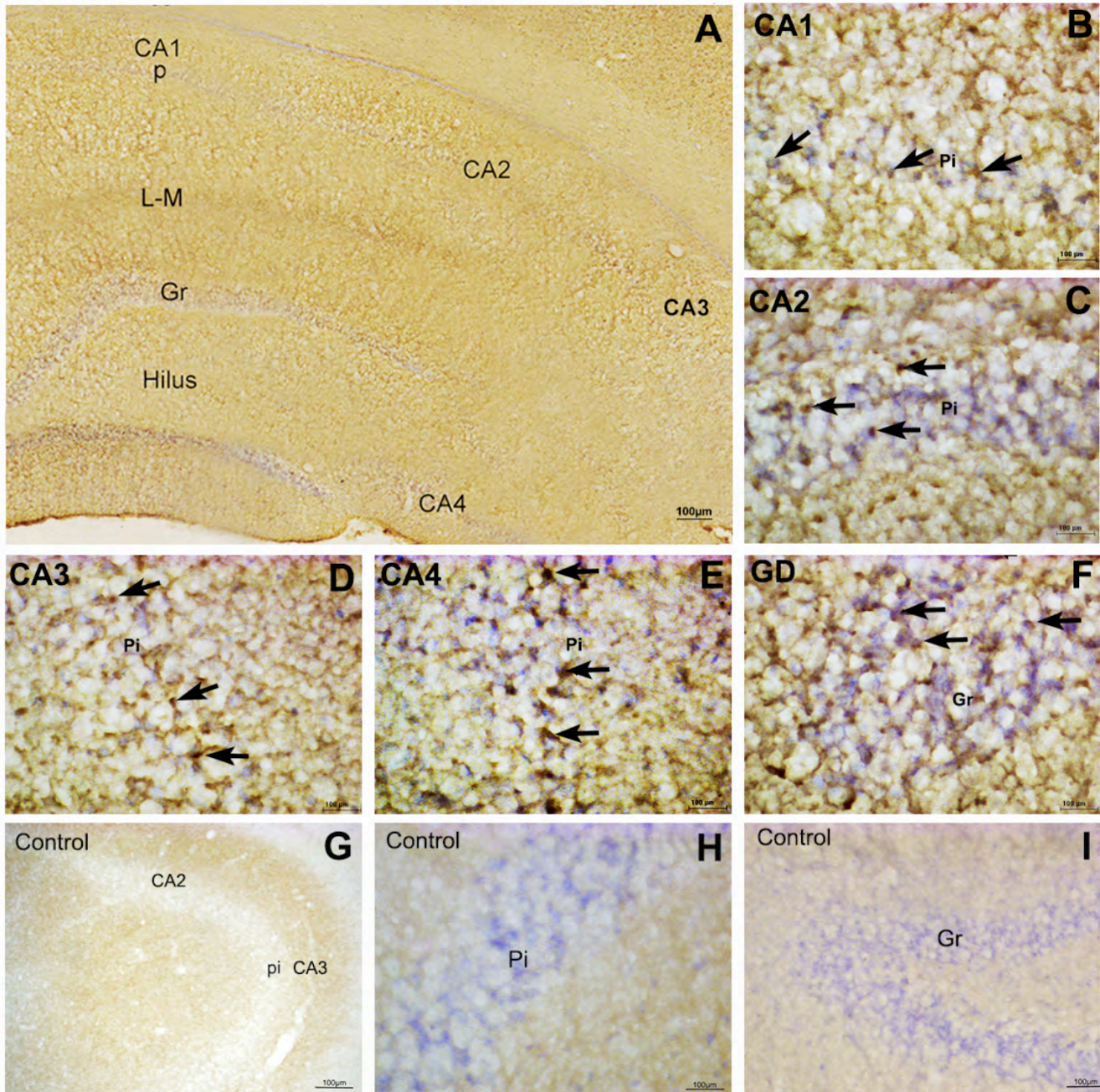


Figura 23. Distribución de la proteína enolasa dentro del hipocampo de la rata macho adulta. A. Mapa del hemisferio derecho del hipocampo dorsal, formada a partir de 20 fotografías tomadas con aumento 5X, en el microscopio óptico que muestra la inmunoreactividad de la enolasa a través del hipocampo (color café); las capas de células principales están teñidas con el colorante violeta de cresilo (azúl). B-F. Imágenes en 20X, señalando con flechas negras, la presencia de células con señal positiva de enolasa (color café), dentro de las capas de células principales del hipocampo (delimitadas en azul); B-E: la capa piramidal; F: capa granular del giro dentado (F). G. Tejido control sin anticuerpo NSE (enolasa) en 5X. H-I. Mismo tejido control, posteriormente contra-teñido con violeta de cresilo para evidenciar que las capas de células principales del hipocampo no presentan señal, CA3 y GD 20X, respectivamente.

## 2.2. Detección del ARNm de la PPII en el hipocampo en tejidos marcados previamente con anti-enolasa

Hemos analizado la localización del ARNm de la PPII, en tejidos marcados previamente con enolasa específica de neuronas, a través del hipocampo de la rata macho adulta. Observamos que las células positivas para enolasa de la capa piramidal y granular, co-localizan con el ARNm de la PPII, detectado a través de hibridación *in situ* (señal autoradiográfica, figura 24), sugiriendo que la síntesis de la PPII, se lleva a cabo únicamente en las neuronas que conforman a estas capas y no en las células gliales del hipocampo.

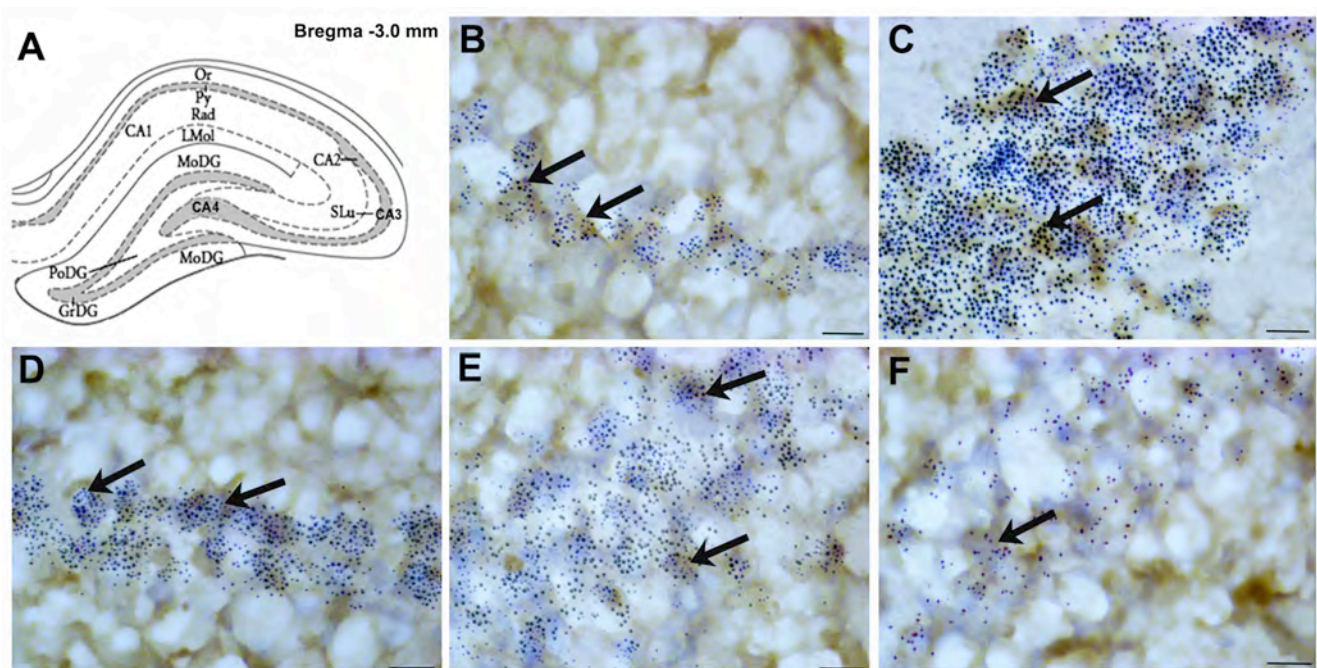


Figura 24. Localización del ARNm de la PPII en las células neuronales del hipocampo de la rata macho adulta. A. Esquema del hipocampo dorsal de la rata adulta (Bregma -3.0 mm) mostrando el nivel al cual fueron hechos los análisis y las subregiones que conforman al hipocampo. En las siguientes imágenes se señalan con flechas células doblemente marcadas con la señal inmunoreactiva de la anti-enolasa (café) y el ARNm de la PPII (granos de plata, color negro) localizadas dentro de las capas piramidal y granular del hipocampo. B. CA1. C. CA2. D. CA3. E. CA4 y F. GD. P, piramidal; Gr, granular La barra corresponde a 100  $\mu$ m. (A: Imagen tomada de Paxinos y Watson, 1986).

### 3. Las células glutamatérgicas del hipocampo de la rata adulta co-expresan el ARNm de la PPII

#### 3.1. Distribución del ARNm de VGLUT1 en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta

Para identificar a la población de células glutamatérgicas presente a través del hipocampo de la rata macho adulta, utilizamos una sonda de ARNc específica del transportador vesicular de glutamato, VGLUT1, la cual fue marcada con digoxigenina 11-UTP a través de una transcripción *in vitro* y detectada en los tejidos con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y revelada con el sustrato DAB, para obtener un producto colorido.

Observamos una amplia distribución de células positivas a la detección del ARNm de VGLUT1 a través de todo el hipocampo, con una distribución heterogénea entre las capas que conforman a cada una de las subregiones. Las capas de células principales del hipocampo fueron los sitios donde el ARNm de VGLUT1 se detectó de manera prominente, con una mayor cantidad de células observada en CA3 y el GD (figura 25). Las células VGLUT1 ARNm+ se observan a mayor aumento (figura 26) en todas las subregiones hipocámpales; parecen coincidir con las células piramidales del CA y granulares del GD. Caso contrario a lo observado para las neuronas GABAérgicas del hipocampo, las cuales presentan una distribución más discreta (Esclapez et al., 1994; Vargas-Orihuela, 2013).

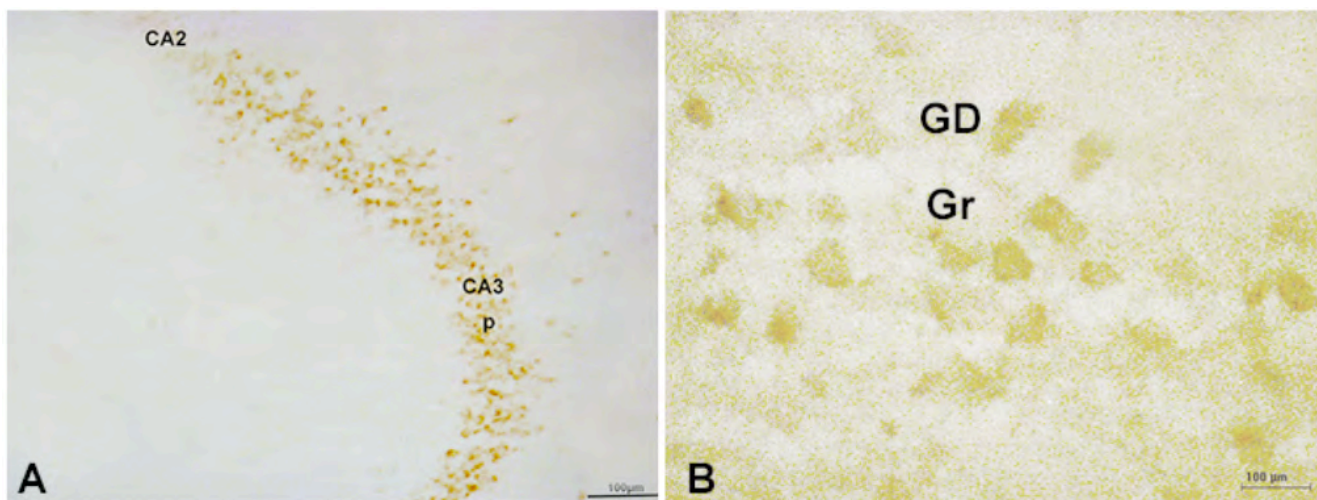


Figura 25. Distribución del ARNm del transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) en el hipocampo de la rata macho adulta. A. En CA3 se observa una población prominente de células glutamatérgicas, detectadas con el ARNm de VGLUT-1, que se distribuyen únicamente en la capa piramidal (5X). B. En el giro dentado, también se observa una importante cantidad de células positivas al ARNm de VGLUT1, localizadas sobre la capa de células granulares (20X). Gr, capa granular; p, capa piramidal.

### 3.2. Distribución del ARNm de la PPII en tejidos marcados con la sonda contra el ARNm de VGLUT1 en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta

Los ensayos de doble hibridación *in situ* arrojaron señales de una colocación VGLUT1-PPII positiva en todas las subregiones del hipocampo. Esta señal es prominente sobre todo en las subregiones de CA3 y CA4; en el GD no parece haber un número significativo de colocaciones (figura 26).

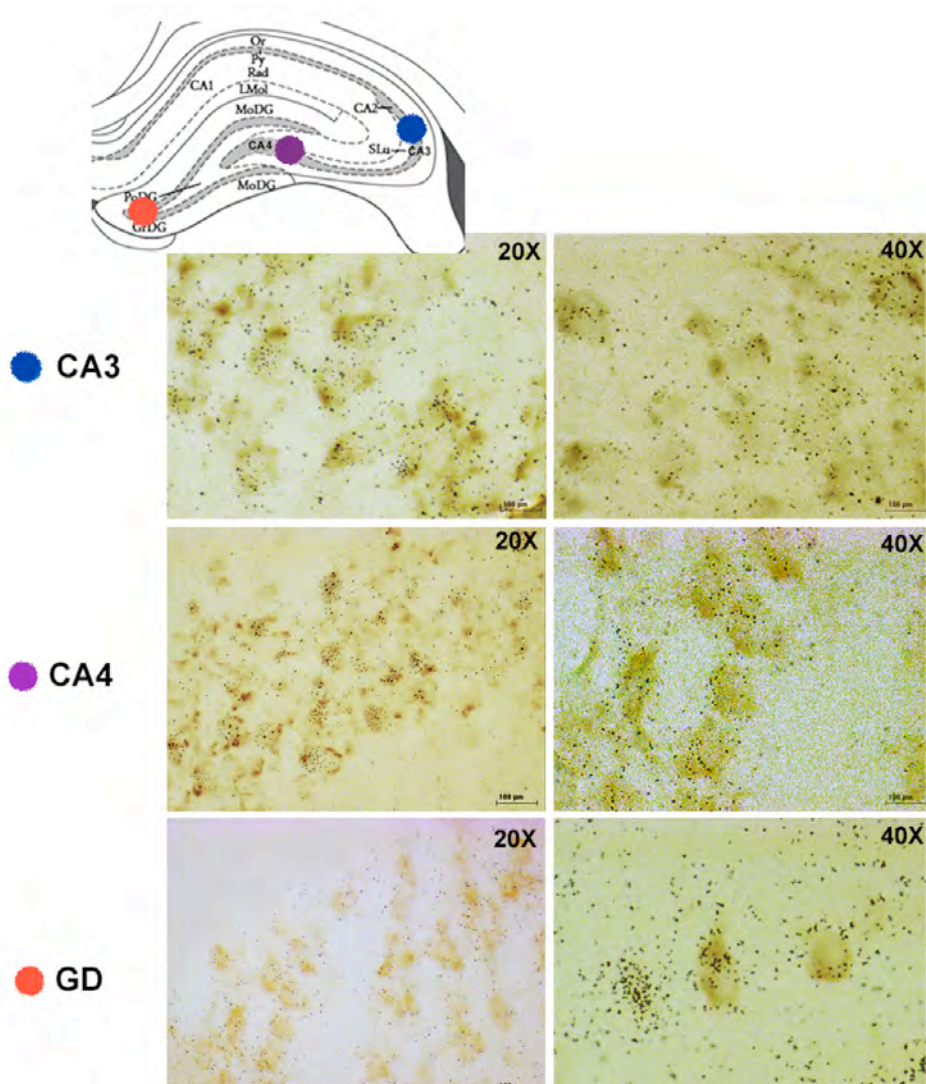
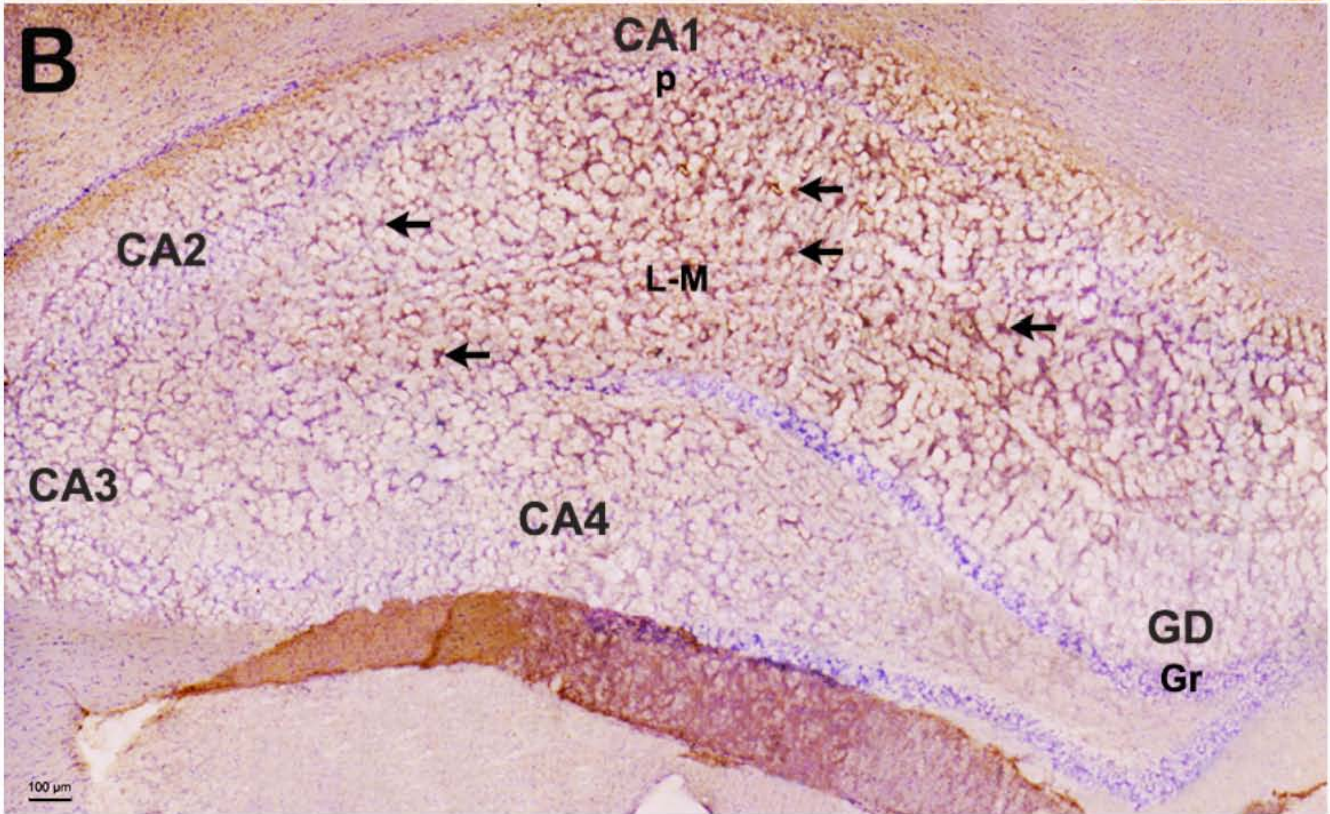
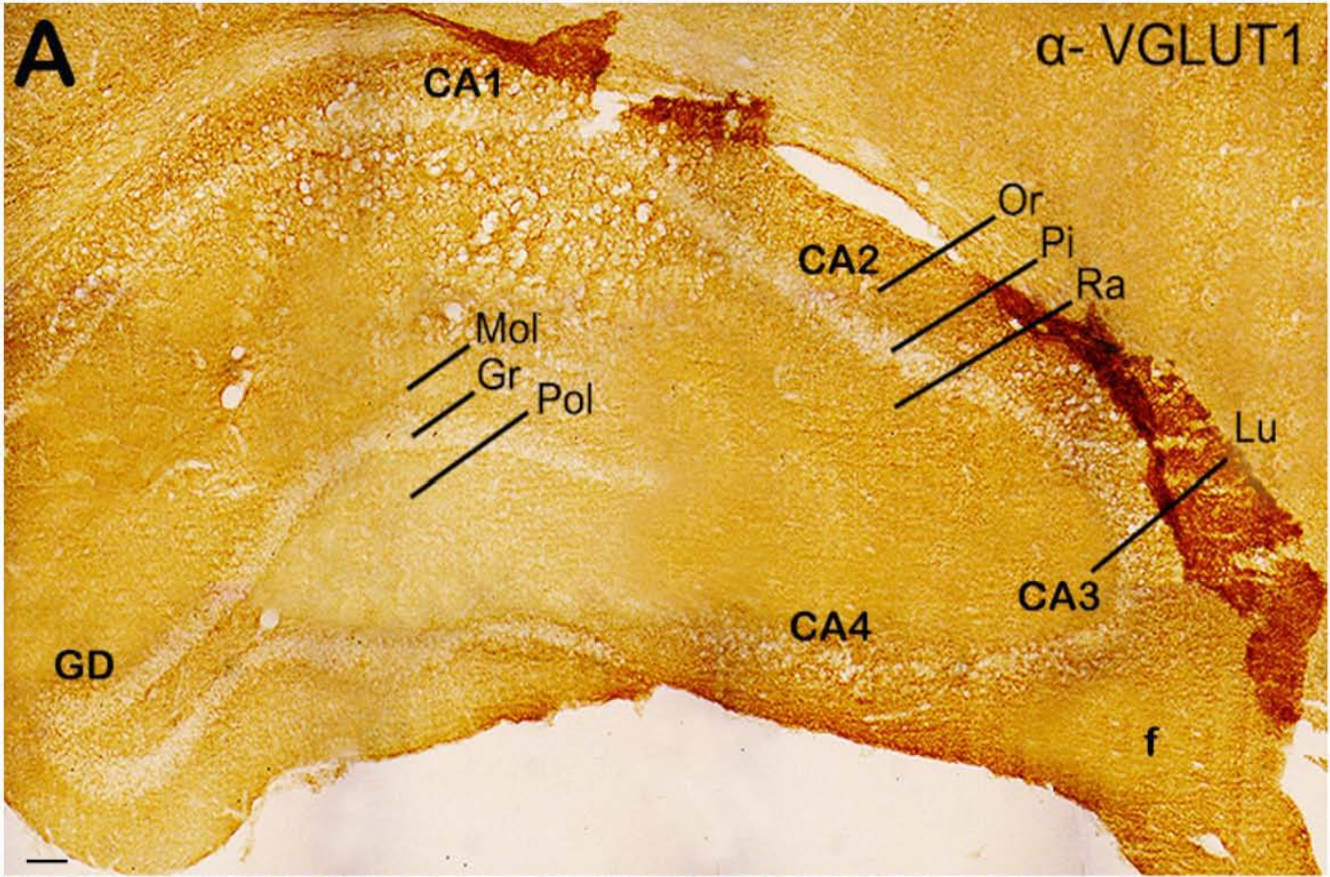




Figura 26. Co-expresión del ARNm de la PPII y de VGLUT1, en el hipocampo de la rata macho adulta. En la parte superior de la figura, se muestra un esquema del hipocampo a nivel dorsal, bregma -3.0 mm, señalando las subregiones del hipocampo donde se realizaron los análisis de co-localización (Imagen tomada de Paxinos y Watson, 1986). Las imágenes de la figura muestran células doblemente marcadas con el ARNm de VGLUT1 (café) y de la PPII (granos de plata negros sobre las células VGLUT1 detectadas a través de doble hibridación *in situ*, observadas en 20 y 40X.

### 3.3. Distribución de la proteína VGLUT-1 en el hipocampo dorsal de la rata macho adulta

La distribución de la señal inmunoreactiva de la proteína transportadora vesicular de glutamato (VGLUT1) empleada en estos ensayos para la localización precisa de los botones sinápticos terminales de las neuronas glutamatérgicas en el hipocampo, reveló ser extensa y abundante en todas las subregiones analizadas. De manera consistente con estudios previos (Kaneko et al., 2002b), el análisis de la distribución de VGLUT1 en nuestros ensayos mostró una distribución de la señal heterogénea; las capas piramidal y granular se encontraron prácticamente desprovistas de señal, mientras que las capas superiores e inferiores a estas láminas de células principales presentaron señal intensa. Un mapa compuesto de una serie de aproximadamente 20 fotografías es presentado en la figura 28.A; en ella se observa un corte teñido con anti-VGLUT1 con una contratinción de violeta de cresilo (azul), para resaltar las células principales en las capas piramidal y granular del hipocampo. Aquí podemos apreciar cómo la señal de VGLUT1 (café) es abundante en el hipocampo en general, con excepción de las capas de células principales del hipocampo (figura 27.A). Sin embargo, algunos perfiles con señal VGLUT1 en forma de pequeños botones sinápticos, fueron detectados dentro de estas capas piramidal y granular y son señalados con flechas blancas en las imágenes de las subregiones hipocámpales a distintos aumentos (20X, figura 27. B-F y 40X, figura 27. G-K). Los perfiles VGLUT1<sup>+</sup> detectados fuera de las capas de células principales del hipocampo son señalados en las imágenes con flechas negras; aunque la capa granular del GD llega a tener perfiles VGLUT1<sup>+</sup>, las capas polimórfica y molecular parecen estar desprovistas de esta señal (figura 27.F y 27.K).



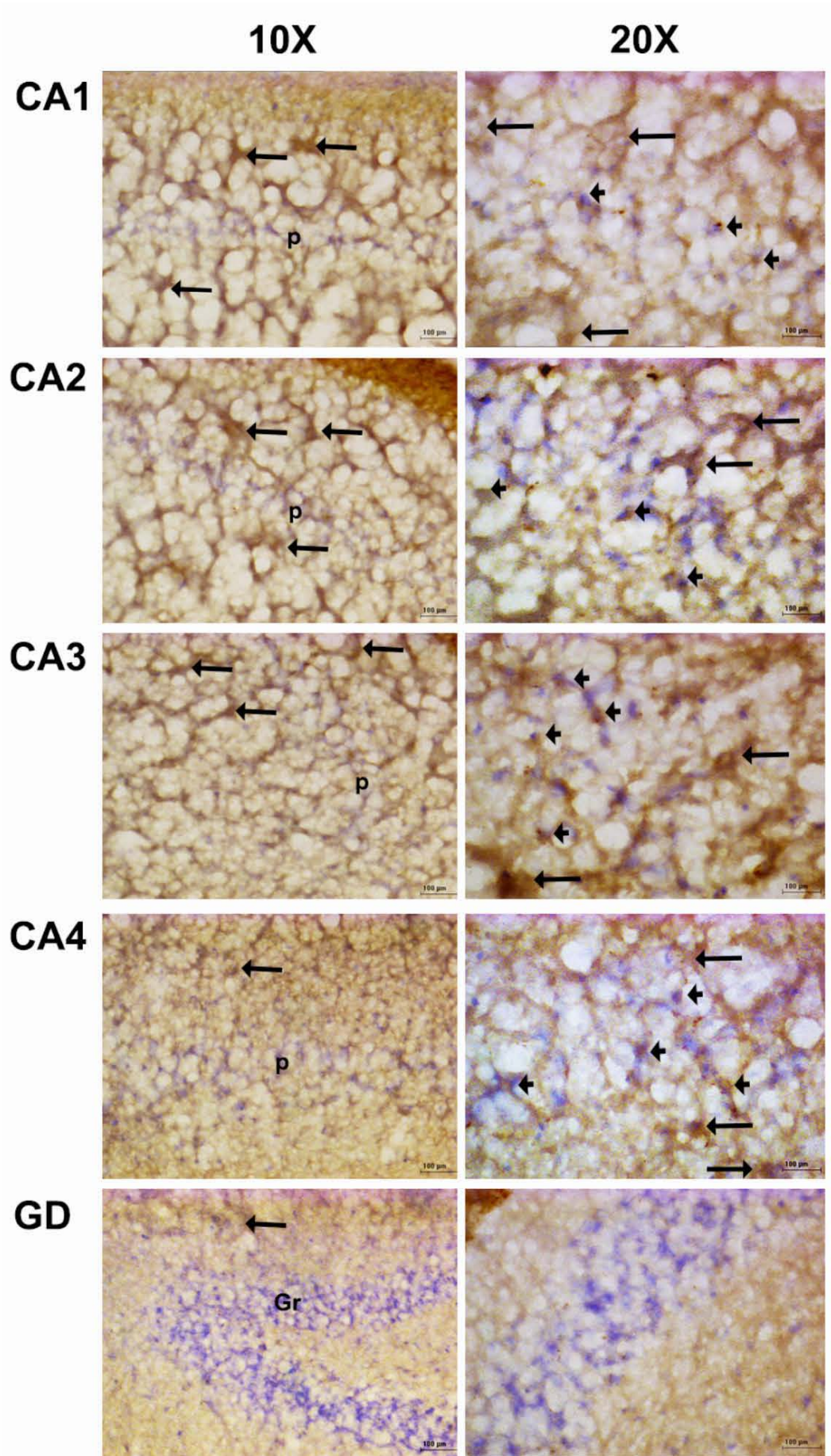


Figura 27. Identificación de las células positivas a la detección con anti-VGLUT1, en el hipocampo de la rata adulta. A. Mapa del hemisferio izquierdo del hipocampo, formado a partir de varias micrografías tomadas con un objetivo 5X. B-K. Serie de imágenes tomadas en 20X de CA1 (B), CA2 (C), CA3 (D), CA4 (E) y GD (F) y sus magnificaciones en 40X de CA1 (G), CA2 (H), CA3 (I), CA4 (J) y GD (K), con el microscopio óptico, que muestran células positivas a la detección de la proteína VGLUT-1 (color café) a través de inmunocitoquímica, en las distintas subregiones del hipocampo, dentro de las capas que conforman a cada una de ellas. A través de una contra-tinción pudieron ser delimitadas la capa de células piramidales y granulares de la formación hipocampal (color azul). Las flechas largas, señalan células con señal de VGLUT1 rodeando por completo los núcleos observados en azul. P, estrato piramidal de CA.

### 3.4. Detección del ARNm de la PPII del hipocampo en tejidos marcados previamente con $\alpha$ -VGLUT1

Algunos perfiles VGLUT1<sup>+</sup> fueron encontrados de manera dispersa sobre los estratos piramidal y granular, en coincidencia con la señal del ARNm de la PPII. Algunos de estos perfiles colocalizaron con el ARNm de la PPII; los llamados perfiles VGLUT1<sup>+</sup>/ARNm PPII<sup>+</sup>.

Después de analizar detenidamente nuestras laminillas dobles (VGLUT1<sup>+</sup>/ARNm PPII<sup>+</sup>), concluimos que la señal de VGLUT1<sup>+</sup> que se encuentra cerca o coincide directamente con el ARNm de la PPII, consiste básicamente en dos tipos de señal. El primer tipo es una señal VGLUT1<sup>+</sup> que claramente rodea el cuerpo celular de lo que pensamos son neuronas piramidales y que están expresando el ARNm de la PPII sobre la capa piramidal de CA. Con este ensayo es difícil definir si esta señal VGLUT1<sup>+</sup> corresponde al marcaje de los cuerpos neuronales de las células glutamatérgicos del hipocampo, o más bien corresponde a la ubicación de múltiples botones sinápticos glutamatérgicos contactando las células ARNm PPII<sup>+</sup> en CA y GD. En el segundo tipo de señal, observamos pequeños puntos de color café aislados, posiblemente terminales sinápticas glutamatérgicas; éstas son generalmente de menor tamaño que un núcleo celular promedio (teñidos en azul en nuestras laminillas), y se pudieron observar encima o en contacto con la superficie de células ARNm PPII<sup>+</sup> en las capas principales del hipocampo. Este segundo tipo de señal, también se llegó a observar de manera aislada, sin estar relacionada a las células ARNm PPII<sup>+</sup>.

Como mencionamos anteriormente, aunque es poca la señal VGLUT1<sup>+</sup> en la capa piramidal y granular del GD, se logran encontrar coincidencias con células mRNA PPII<sup>+</sup> (figura 28), las

cuales parecen ser más frecuentemente observadas en CA2, CA3, CA4 y CA1; por último en el GD estas coincidencias son escasas y difíciles de visualizar. Las flechas azules de la figura 28 señalan células ARNm PPII<sup>+</sup> que son el tipo de señal con mayor representación en estas laminilla.

Figura 28. Co-localización del ARNm de la PPII en células y terminales glutamatérgicas del hipocampo de la rata macho adulta. A. Esquema del hipocampo dorsal de la rata adulta (Bregma -3.0 mm), mostrando el nivel al cuál fueron hechos los análisis y las subregiones que conforman al hipocampo. En las siguientes imágenes se señalan con flechas largas (negras), células doblemente marcadas con la señal inmunoreactiva de la anti-VGLUT1 (café) y el ARNm de la PPII (granos de plata, color negro) que se localizan dentro de la capa piramidal de CA. Con puntas de flechas (negras) se señalan las terminales sinápticas glutamatérgicas, localizadas sobre células PPII positivas, o rodeándolas. Por último, las flechas azules señalan células únicamente positivas al ARNm de la PPII. B. CA1. C. CA2. D. CA3. E. CA4 y F. GD (Imagen tomada de Paxinos y Watson, 1986).

Estas mismas observaciones fueron reproducidas en subregión CA3 en su porción ventral en la parte posterior del hipocampo (Bregma -5.52mm, figura 29.A). Aquí fue identificada el mismo tipo de perfil VGLUT1<sup>+</sup>/ARNm PPII<sup>+</sup>; son señalados con puntas de flecha los perfiles ubicados dentro de la capa piramidal. Los perfiles VGLUT1<sup>+</sup> localizados en los estratos oriens y radial de CA3, son señalados también con flechas (figura 29.B). En el giro dentado en su porción ventral en el hipocampo posterior, no se observó señal de VGLUT1<sup>+</sup>, las células granulares se observan con la tinción con violeta de cresilo (azul, figura 29.C).

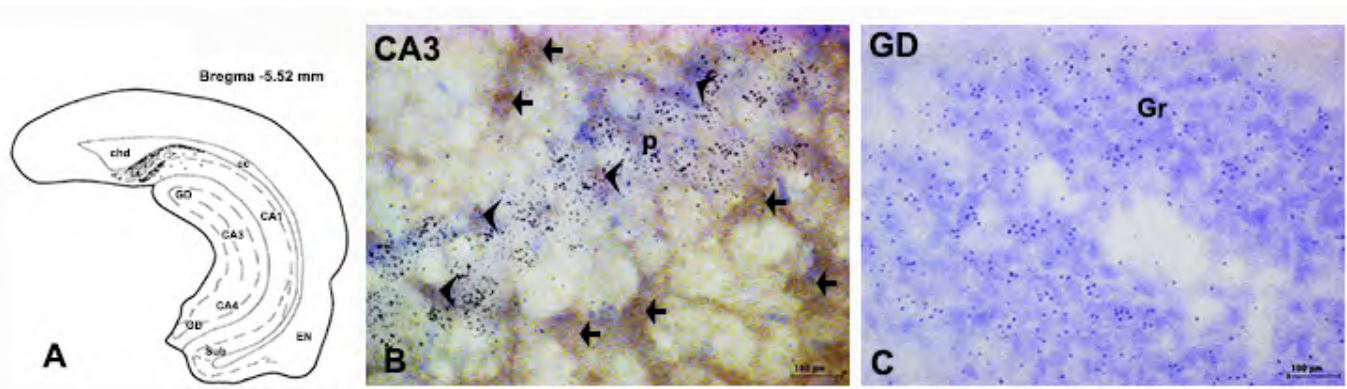


Figura 29. Co-localización del ARNm de la PPII en las células y terminales glutamatérgicas del hipocampo posterior de la rata macho adulta. A. Esquema del hipocampo ventral de la rata adulta (Bregma -5.52 mm) mostrando el nivel del hipocampo al cuál fueron hechos los análisis y las subregiones que lo conforman. B. Imagen del CA3 del hipocampo posterior en 20X. Las flechas largas (negras) muestran células inmunoreactivas a VGLUT1, dispersas a través de todas las capas de CA3; señalado con puntas de flechas, se observan terminales sinápticas de glutamato que coinciden con el ARNm de la PPII dentro de la capa piramidal. C. Imagen del giro dentado del hipocampo en 20X, con el ARNm de la PPII (granos de plata, color negro), en la que no se observa señal VGLUT1 (Imagen tomada de Paxinos y Watson, 1986).

#### **4. Análisis preliminar del fenotipo de las células que expresan el ARNm de la PPII en la corteza frontal**

Como parte del mismo proyecto de fenotipificación de las células que expresan a la PPII, se realizaron análisis de la colocación de los ARN's que codifican para la enzima de síntesis del GABA, la GAD65 y la PPII en otras regiones del cerebro de la rata adulta. Se analizó en particular la corteza frontal, por las razones mencionadas en la introducción.

##### **4.1. Distribución de las células que co-expresan el ARNm de GAD65 y PPII en la corteza frontal de la rata macho adulta**

En la corteza frontal se observó que casi todas las células GABAérgicas co-expresan a la PPII, tanto en las capas superficiales (I-II), como en las profundas (V-VI), (figuras 30 y 31, respectivamente).

En las capas profundas de la corteza el número de células ARNm PPII<sup>+</sup> por unidad de superficie fue  $50.4 \pm 7.2$  (media  $\pm$  D.E., 4 animales), de células ARNm GAD65<sup>+</sup>,  $22.8 \pm 1.8$ , y de células ARNm GAD65<sup>+</sup>/ARNm PPII<sup>+</sup>,  $20.6 \pm 2.0$ . Los resultados fueron similares en las capas superficiales de la corteza: el número de células ARNm PPII<sup>+</sup> fue  $66.8 \pm 3.7$ , de células ARNm GAD65<sup>+</sup>,  $28.4 \pm 0.2$ , y de células ARNm GAD65<sup>+</sup>/ARNm PPII<sup>+</sup>,  $27.1 \pm 0.2$ .

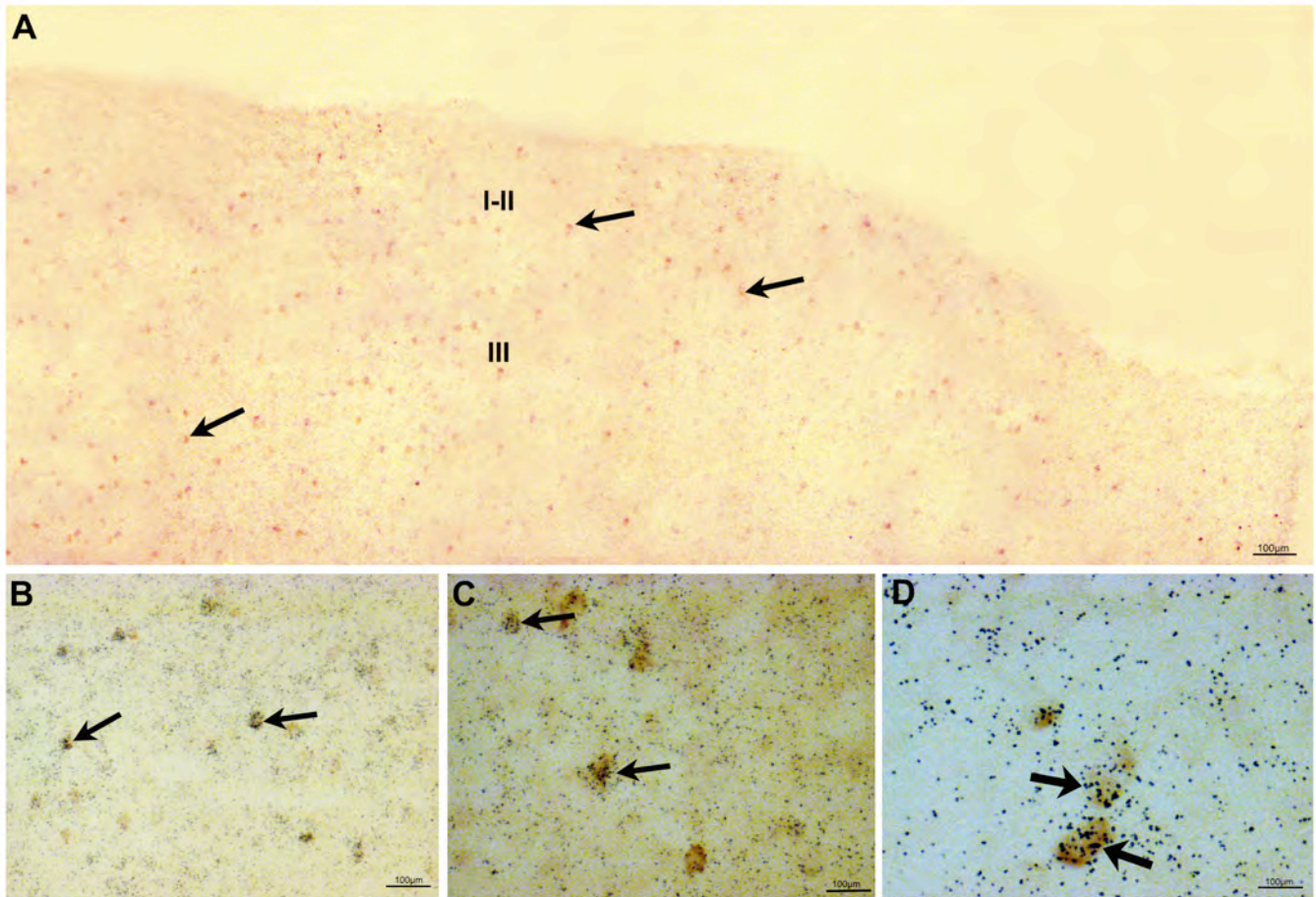


Figura 30. El ARNm de la PPII colocaliza con el ARNm de GAD65 en las capas superficiales de la corteza cerebral de la rata. A. Mapa de la distribución de las células ARNm<sup>+</sup> PPII y ARNm<sup>+</sup> de GAD65 en las capas I-III de la corteza frontal, conformado por 18 imágenes adquiridas en el microscópio óptico con aumento 5X muestran las capas donde fueron realizadas las observaciones. B. Imágenes de células ARNm<sup>+</sup> GAD65 (color café) y ARNm<sup>+</sup> PPII (granos de plata) a distintos aumentos B, 10X. C, 20X y D, 40X. Las flechas negras se encuentran señalando algunas células doblemente marcadas.

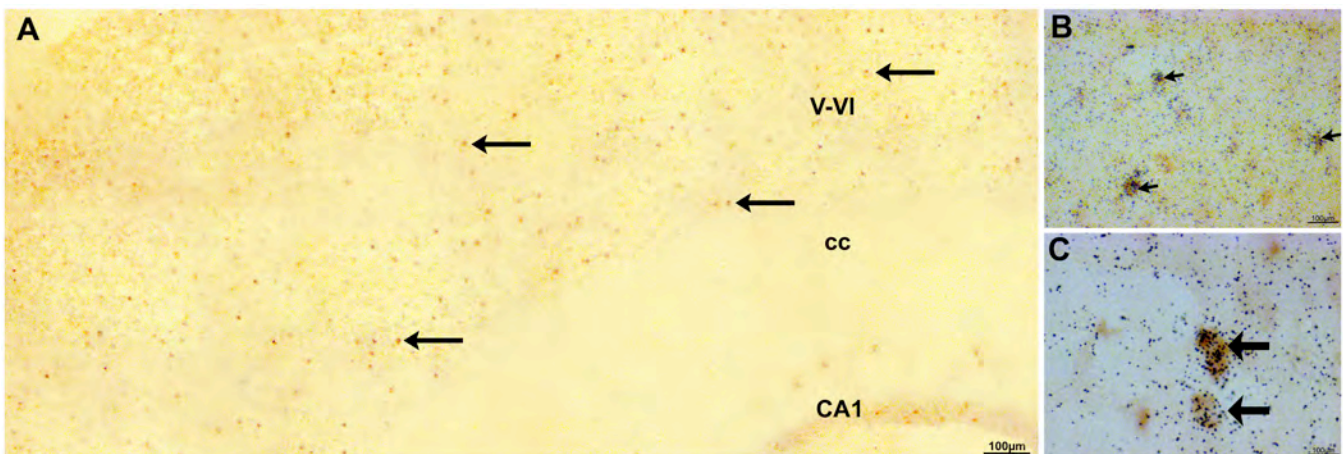




Figura 31. Mapa de la co-localización de PPII/GAD65 en las capas más profundas de la corteza cerebral de rata. En la primera columna (izquierda) se muestran células positivas al ARNm de GAD65. En las demás columnas apreciamos células doblemente positivas a los ARN mensajeros de PPII y GAD65 vistos a distintos aumentos del objetivo (10X, 20X, 40X). La imagen de la microradiografía muestra con un cuadro la región de la corteza donde fueron tomadas las fotografías. Las flechas negras señalan algunas de las células doblemente marcadas PPII-GAD65. Las flechas blancas señalan células únicamente GAD65+ que se encuentran rodeando la las dobles.

#### 4.2. Relación entre las células que expresan a la PPII y las señales de VGLUT1 en la corteza frontal de la rata adulta

En la corteza frontal observamos que la señal inmunoreactiva del transportador vesicular VGLUT1<sup>+</sup> es intensa; se observó además un número elevado de co-localizaciones con el ARNm de la PPII, en todas las capas que la conforman, excepto en la capa IV, desprovista de señal VGLUT1 (figura 32).

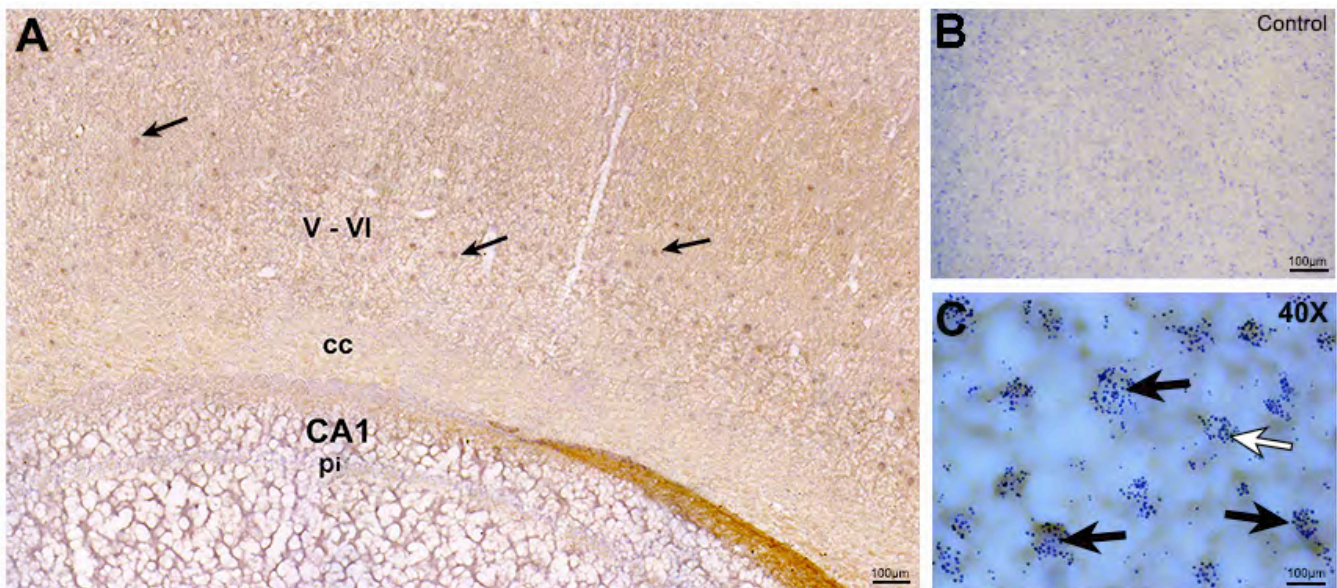


Figura 32. Identificación de las células positivas VGLUT1/PPII en la corteza frontal de la rata adulta. A. Mapa de una sección de la corteza frontal, formada a partir de 20 fotografías tomadas con un aumento 5X en el microscopio óptico, mostrando la inmunoreactividad de la proteína VGLUT1 (color café), a través de las capas V y VI que conforman esta región. B. Las células piramidales de la corteza se identificaron por la tinción con el colorante violeta de cresilo (azúl) en el control, no hay señal VGLUT-1. C. Células PPII-VGLUT1<sup>+</sup>, localizadas en las capas más profundas de la corteza (V-VI) son señaladas con flechas negras, también se observan células ARNm<sup>+</sup>- PPII y son señaladas con flechas blancas. cc, cuerpo calloso, Pi, capa piramidal del hipocampo.

## DISCUSIÓN

La comunicación por péptidos en los sistemas nerviosos involucra su interacción con receptores de membrana plasmática, y a menudo su hidrólisis por ectopeptidasas, que parecen controlar su vida media extracelular y algunos de sus efectos. Este modelo ha sido comprobado en varios contextos, si bien falta una comprensión plena del papel de las ectopeptidasas en el sistema nervioso central, que es complicada por la multiplicidad de enzimas para cada péptido, de substratos para cada enzima y la heterogeneidad celular. El par TRH/PPII parece representar una situación simplificada, que puede ser aprovechada para identificar y probar nuevos conceptos.

La TRH, un neuropéptido inicialmente identificado por jugar un papel importante en la regulación de la liberación de TSH por la adenohipófisis, ha sido catalogada como un neuromodulador debido a la gran variedad de efectos producidos en el cerebro, efectos consistentes con la amplia distribución del ARNm de su proteína precursora, la Pro-TRH, así como de sus elementos de respuesta, los receptores TRH-R1 y TRH-R2 y la enzima encargada de su inactivación extracelular, la PPII. Esta es una ectoenzima que hidroliza de manera altamente específica el enlace pGlu-His de la TRH, su único sustrato biológico conocido (Charli et al., 1998; Lazcano et al., 2012; Sánchez et al., 2013).

Estudios *in vivo* e *in vitro* indican que la PPII expresada por los tanicitos de la eminencia media del hipotálamo, regula la acción de la TRH, controlando la cantidad de péptido que llega a la adenohipófisis (Sánchez et al., 2009); en el séptum la inhibición de la PPII potencia los efectos analépticos de la TRH en animales narcotizados con etanol (Lazcano et al., 2012). Sin embargo, a pesar de que han sido reconocidas las regiones cerebrales donde el ARNm de la PPII se localiza, así como su actividad enzimática, los tipos celulares donde la enzima se localiza apenas están siendo dilucidados, y su papel funcional preciso no está aclarado.

La TRH está involucrada entre otros aspectos con la regulación de la eficacia de la comunicación por GABA, glutamato y acetil-colina dentro del hipocampo. El estado de alerta, la memoria y el aprendizaje, son influenciados de manera importante por la TRH y existen evidencias de que el circuito hipocampal es uno de los blancos que explica estas acciones de

la TRH. La evidencia que vincula a la TRH con la modulación de las propiedades electrofisiológicas de poblaciones neuronales de tipo inhibitorio como las GABAérgicas, o excitatorias glutamatérgicas en el hipocampo y la corteza cerebral, alterando generalmente la frecuencia de disparos de potenciales de acción y/o la liberación de neurotransmisores (Ishihara et al., 1991, 1992; Stocca y Nistri, 1994, 1995, 1996; Atzori y Nistri, 1996; Sakata-Haga et al., 2001; Ziegler et al., 2002; Fremeau Jr et al., 2004; Deng et al., 2006, Molina et al., 2013 sometido), nos motivó a explorar con detalle el fenotipo de las células que expresan el ARNm de la PPII, tomando como candidatos primordiales estos dos tipos de poblaciones neuronales.

Para desarrollar los objetivos señalados al inicio de este trabajo, elegimos emplear la técnica de hibridación *in situ*, por ser altamente específica para la detección a nivel celular de ARNm; en algunos casos esta técnica fue combinada a una inmunohistoquímica. Por otro lado, debido a que los transcritos de la PPII no son abundantes, decidimos detectarlos con una sonda radioactiva, un método que incrementa la sensibilidad de la detección por hibridación *in situ*. Debemos señalar que esta metodología tiene algunas limitaciones que son importantes de discutir.

En particular, hemos identificado las células PPII+, en base a la expresión del ARNm, y queda la posibilidad de que en algunas células, este ARN no se traduzca, o que el ARNm detectado no sea funcional. Por ejemplo, se sabe que un producto de “splicing” alternativo del ARN de la PPII produce una proteína que no tiene actividad enzimática, nombrada PPII truncada (PPII\*) y se puede detectar esta proteína en el hipocampo. Sin embargo, es claro que la proteína completa y activa es la más abundante en el hipocampo (Rodríguez-Molina et al, 2009), lo que coincide con la detección de una actividad enzimática importante en esta estructura (Vargas et al, 1987). Por lo tanto, a pesar de que la sonda que fue utilizada en estos experimentos detecta las dos isoformas de la PPII (completa y truncada), es probable que muchas de las células detectadas en este estudio sean células que expresan a la proteína activa. Sin embargo, una demostración definitiva está limitada por la falta de anticuerpos selectivos para la proteína activa; sondas de ARN específicas para la PPII completa vs la PPII truncada ayudarían en parte a resolver esta duda.

En cuanto a la especificidad de las imágenes, en las condiciones optimizadas en esta tesis,

observamos señales cuya distribución es totalmente compatible con datos previos en la literatura. Además, en cada uno de los ensayos de inmunohistoquímica, controles sin anticuerpo primario no generaron ninguna señal (imágenes no mostradas). No tenemos por lo tanto dudas sobre la especificidad de lo observado.

Otra limitación de la metodología es la resolución de las señales. En particular la detección de la sonda antisentido del ARNm de PPII con una emulsión fotográfica genera una señal dispersa alrededor del sitio de emisión de la radiación. Esta dispersión debe tomarse en cuenta para la interpretación de las imágenes. Para limitar estos problemas, tomamos como positivos únicamente perfiles con un número importante de granos, lo que deja poca duda sobre los sitios donde está concentrado el ARN. Por otro lado, algunos de los marcadores, que hemos utilizado para la inmunohistoquímica no se localizan únicamente en somas, por lo que las imágenes a veces tienen una interpretación compleja.

Los datos que tenemos son en general cualitativos, y cuando damos datos cuantitativos, se tienen que entender como una aproximación, ya que no hemos utilizado métodos de estereología para un análisis cuantitativo riguroso. Sin embargo, son suficientes para tener una idea muy buena de la distribución de los fenotipos de las células PPII<sup>+</sup> a lo largo del hipocampo.

En resumen, a pesar de las limitaciones sobre el tipo de marcador analizado y la resolución de las señales, los controles y los criterios que hemos utilizado, y la consistencia de los datos con la literatura, nos hacen tener una seguridad muy buena de que nuestras conclusiones sean sólidas.

Esta metodología nos permitió observar que el ARNm de la PPII se expresa de manera abundante en el hipocampo y en la mayoría de las capas de la corteza cerebral. En el hipocampo está confinado a la capa de células piramidales de CA, ubicación ideal para sugerir que son las células piramidales del hipocampo las que principalmente sintetizan el ARNm de la enzima. La señal es casi nula en regiones como el giro dentado del hipocampo, el tálamo o la capa 1 de la corteza cerebral, de acuerdo a lo reportado anteriormente por Heuer et al., 1998. Dentro del hipocampo observamos niveles de expresión diferenciales, mayores en CA2, seguidos por los detectados en CA4, CA3 y CA1. Además, la hibridación *in*

*situ* con la sonda de ARNc de PPII es consistente con estudios previos, con una relativamente abundante población de perfiles marcados intensamente en la corteza cerebral.

Lo primero que aclaramos es si era posible adscribir la expresión de la PPII a uno de los dos tipos principales de células que conforman al cerebro, las neuronas. Tal como era esperado, los granos de plata se acumularon muy cerca de los perfiles marcados por un marcador neuronal, la enolasa específica de neuronas. La localización en neuronas es consistente con datos experimentales previos que mostraron que en cultivos primarios mixtos de neuronas y de células gliales la PPII parece coincidir con neuronas, ya que la muerte neuronal provoca una caída de la actividad y que cultivos enriquecidos en células gliales no presentan a la actividad (Cruz et al, 1991). Además, están los datos de Bauer et al., 1990 en el mismo sentido. Los datos en el hipocampo indican que prácticamente todas las células que expresan a la PPII son neuronas, o sea positivas para la NSE.

Debido a que se descubrió recientemente que células de tipo glial expresan a la PPII en la base del tercer ventrículo tanto en condiciones basales como ante la inhibición del eje por un aumento de las HT (Sánchez et al, 2009), se decidió analizar adicionalmente la posibilidad de que la PPII, también pudiera ser expresada por células de tipo glial en el hipocampo. Escogimos investigar a los astrocitos, por su relación ontogénica con los tunicitos. Estas células se detectaron por inmunohistoquímica con un anticuerpo anti- proteína glial ácida de filamentos (GFAP). La GFAP esta presente en cantidad muy importante dentro del hipocampo. Pudimos observar que las capas de células principales se encuentran completamente desprovistas de astrocitos, los cuales se localizan más bien adyacentes a estas capas a través de toda la formación hipocampal, confinadas a las capas oriens de CA y polimórfica del giro dentado. No fueron reconocidos perfiles GFAP<sup>+</sup> que expresaran a la enzima PPII en ninguna de las subregiones del hipocampo. La posibilidad de que haya PPII expresada en otro tipo glial (por ejemplo microglía) es pequeña, debido a la coincidencia muy importante con las neuronas. Sin embargo, queda la opción de que situaciones fisiológicas o patológicas particulares (por ejemplo, las que llevan a la activación de mecanismos de defensa al daño) propicien una expresión de PPII en células gliales. Estos datos sugieren que la existencia de la PPII en células gliales (tunicitos), en la pared del tercer ventrículo, es

un fenómeno probablemente muy localizado, peculiar de las necesidades de comunicación en esta región del cerebro.

Llama la atención que una de las subregiones donde hubo una exacerbada cantidad de astrocitos, relacionados entre otras funciones con mecanismos de regeneración y neuroprotección después de sufrir alguna lesión, fue el GD en su porción de células polimórficas o hilus. Esta es una de las subregiones con mayor susceptibilidad a sufrir daños por una sobre estimulación de las sinapsis excitatorias, tal como es observado al quedar establecido en el modelo de epilepsia experimental (*kindling*) en roedores. Es interesante notar que la casi nula expresión del ARNm de la PPII el GD en condiciones basales, o cuando está establecido el *kindling* (etapa V), provee condiciones idóneas para que la TRH liberada por la sobre estimulación lleve a cabo sus efectos neuroprotectores. Estos datos coinciden con la estricta protección de esta subregión a sufrir algún daño a causa de una sobre-estimulación eléctrica (Rosen et al., 1992), tomando en cuenta que es la vía de entrada de las señales eléctricas que vienen principalmente de la corteza.

En apoyo a la idea de que la PPII es más bien en general una enzima neuronal, están los datos de identificación de la enzima en las neuronas glutamatérgicas del hipocampo, identificadas a través de la detección del ARNm del transportador vesicular de glutamato, VGLUT1, comúnmente utilizado por ser expresado por las neuronas glutamatérgicas del SNC. Observamos que esta región contiene una cuantiosa población de células glutamatérgicas, principalmente dentro de la capa piramidal y granular del hipocampo, con niveles de expresión más elevados en CA3 y el GD. Estas neuronas glutamatérgicas son señaladas como la principal población neuronal de esta región, ampliamente estudiadas por su relación con la coordinación de los procesos de memoria y el aprendizaje. A través de una doble hibridación *in situ*, confirmamos que el ARNm de la PPII coincide con el ARNm de VGLUT1 en todas las subregiones hipocampales. Observamos células ARNm VGLUT1+/PPII+ de manera prominente en CA3 y el GD, así como en el CA3 de la zona posterior del hipocampo, sitios conocidos por estar conectados a través de las proyecciones glutamatérgicas enviadas del GD a CA3, conocidas como fibras musgosas, y conexiones de CA3 a CA1, conocidas como la vía colateral de Shaffer, implicadas con el flujo de información dentro del circuito tri-sináptico hipocampal. Además, dentro del circuito hipocampal estos sitios están ligados a los procesos de memoria espacial y aprendizaje; por

ejemplo, en animales sometidos a la prueba del laberinto de agua, se observa en estas regiones un incremento en la expresión de la pro-TRH y de TRH-R1 (Aguilar-Valles et al., 2007). La localización de células VGLUT1+-PPII+, y el hecho que la TRH incremente la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1 y CA3, a través de la generación de potenciales post-sinápticos excitatorios (EPSPs) mediados por el receptor NMDA (Ishihara et al., 1991, 1992; Stocca y Nistri, 1994, 1995; Atzori y Nistri, 1996), sugieren que los efectos de la TRH sobre la transmisión glutamatérgica en el hipocampo son limitados por la acción de la PPII. Esta hipótesis tendrá que ser confirmada experimentalmente.

A través de la técnica de inmunohistoquímica, pudimos realizar la identificación de la proteína VGLUT1, se distribuyó de manera específica de regiones cerebrales como la corteza, el hipocampo y la amígdala. En el hipocampo los perfiles de VGLUT1 estuvieron confinados principalmente a la capas oriens, radial y lacunosum-molecular de CA, así como la capa polimórfica e hilus del giro dentado, con una esperada falta de expresión en las capas principales del hipocampo, piramidal y granular, de acuerdo a los reportes previos (Ni et al., 1994; Bellochio et al., 1998; Fremeau et al., 2001; Herzog et al., 2001; Kaneko et al., 2002). En nuestras observaciones en hipocampo y corteza cerebral, en las capas principales del hipocampo, la señal VGLUT1 estuvo presente en forma de aposiciones o pequeños botones sinápticos que se encontraban generalmente en la periferia o sobre los cuerpos neuronales de células que podían o no estar expresando el ARNm de la PPII o presentando una distribución peri-nuclear alrededor de células que presentaban perfil positivo al ARNm de PPII. Hacia la parte del hipocampo más caudal, la parte posterior, la señal de Vglut1 sigue los mismos patrones de distribución, y observamos perfiles de ARNm VGLUT1+/PPII+ en la parte ventral de CA3 pero no en el giro dentado.

Estos datos de inmunohistoquímica con un anti-VGLUT1 mostraron entonces que además de encontrar una población importante de células ARNm+ de VGLUT1 en las capas principales del hipocampo, que deben corresponder a los somas de neuronas glutamatérgicas, estas células podrían también estar siendo contactadas por proyecciones excitatorias glutamatérgicas provenientes del mismo hipocampo o del exterior. Muchas células PPII ARNm+ de la capa piramidal y de la capa granular del giro dentado estuvieron rodeadas por terminales VGLUT1+. Esto indica que las neuronas PPII+ de las capas CA y giro dentado reciben información de proyecciones glutamatérgicas, que probablemente pertenecen a circuitos locales intra-hipocampales. Este arreglo es consistente con que las células PPII

ARNm+ son neuronas piramidales.

Las neuronas glutamatérgicas parecen ser el subtipo más importante que expresa a la PPII en el hipocampo, basado en el análisis cualitativo de las dobles *in situ*. Sin embargo, la expresión de la PPII no es exclusiva de las neuronas glutamatergicas, ya que resultados previos de mi tesis de licenciatura indican que en el hipocampo una pequeña fracción de las células que expresan a la PPII son neuronas GABAérgicas presentes en la capa piramidal de CA y granular del GD (Vargas; 2013).

La corteza es otra de las regiones donde se han hecho grandes esfuerzos por lograr aclarar los efectos de la TRH. En esta región bajos niveles de expresión del ARNm de la pro-TRH coinciden con una concentración del péptido baja, si bien una liberación basal importante de péptido ha sido detectada *in vitro* en ciertas subregiones (Méndez et al, 1987). Múltiples evidencias muestran que la TRH regula la comunicación sináptica y la excitabilidad neuronal en la corteza. Por ejemplo, en la corteza sensorimotora, los efectos de la TRH *in vivo* incluyen inhibición de la excitabilidad neuronal espontánea o inducida por glutamato, o alternativamente potenciación de la actividad excitatoria de la acetilcolina. Estas acciones opuestas pudieran depender de subpoblaciones blanco distintas (Braitman et al, 1980). Estos efectos se observan a pesar de una baja densidad de sitios de unión del péptido en esta región. Estos sitios de unión pudieran deberse a la expresión de TRH-R2, ya que los niveles del ARNm de TRH-R2 son más elevados en esta zona que en otras regiones del cerebro (Heuer et al., 2000). Esto nos sugiere que independientemente del fenotipo neuronal de las células, ya sean GABAérgicas, glutamatérgicas, etc... podrían en algún momento, dependiendo del contexto expresar el ARNm de la PPII.

La corteza presenta altos niveles del ARNm de la PPII y una muy elevada actividad de la PPII (Heuer et al., 2000; Lazcano et al., 2012). Estudios previos no aclararon el fenotipo de las células que expresan a la PPII en la corteza, si bien eran consistentes con expresión de PPII en neuronas piramidales. Centrándonos en el análisis de los perfiles que identificamos con anti-VGLUT1 en la corteza, este marcador de terminaciones axónicas fue observado de manera consistente con la distribución de la señal previamente reportada (Kaneko et al., 2002) a través de todas las capas de la corteza, excepto en la capa IV donde su señal es nula. En la corteza cerebral, tanto en las capas superiores como en las internas, excepto en la capa IV (Fremeau Jr., 2004b), encontramos una vasta cantidad de señal VGLUT1+, la



mayoría rodeando los núcleos celulares teñidos con el colorante violeta de cresilo y observamos en color azul en los tejidos. Nuestras observaciones de perfiles de gran tamaño expresando VGLUT1 en cuerpos celulares, o más bien perfiles perisomáticos rodeando las neuronas piramidales en la corteza, son similares a los descritos por Alonso-Nanclarez et al., 2004. Muchas células PPII ARNm+ estuvieron rodeadas por terminales VGLUT1, por lo que al parecer las neuronas piramidales son las que están expresando a la PPII. Para confirmar esta interpretación, evidencia independiente con marcadores de neuronas piramidales es requerida. Sin embargo, los resultados sugieren que la PPII se localiza en una posición óptima para controlar la acción de la TRH sobre la excitabilidad de las neuronas piramidales. Recientemente se demostró en el laboratorio que la TRH regula la forma del potencial de acción (PA) generado por neuronas piramidales de la corteza sensorimotora. Además, en rebanadas de corteza un inhibidor de la PPII reproduce los efectos del TRH, posiblemente porque aumenta la vida media del TRH endógeno liberado al medio extracelular (Rodríguez-Molina, 2013 sometido). Por lo tanto, los datos de localización parecen explicar la sensibilidad del potencial de acción a la inhibición de la PPII. Estos datos también refuerzan la interpretación que el efecto de la TRH en la forma del PA es directa hacia las neuronas piramidales, dado que la PPII es considerada un marcador de los blancos de la TRH.

Sin embargo, de manera similar a lo observado en el hipocampo, la información que obtuvimos sobre el tipo de células que expresan a la PPII en esta región, reveló que adicionalmente en la corteza existe una gran cantidad de células GABAérgicas, identificadas mediante la detección del ARNm de una isoforma de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico, GAD65, por hibridación *in situ*, distribuidas a través de todas las capas corticales. La distribución del ARNm que codifica para la GAD65, fue consistente con las observaciones de Esclapez et al., 1993. Encontramos que la señal del ARNm de GAD65 se expresa en regiones cerebrales como el hipocampo, corteza y núcleo reticular talámico. De manera similar a nuestros resultados previos de la co-expresión del ARNm de la PPII en una fracción de neuronas GABAérgicas del hipocampo (Vargas-Orihuela, 2013), observamos que esta colocalización es observada en todas las capas corticales del cerebro de la rata, predominantemente en las capas II-III y V-VI y su distribución es homogénea.

Sin embargo, el patrón es distinto ya que de manera inesperada, casi en su totalidad estas neuronas fueron positivas a la detección del ARNm de la PPII (GAD65+/PPII+), por lo que sugerimos que la PPII se expresa en la gran mayoría de las células GABAérgicas corticales.

Este dato sugiere que, de manera similar al hecho que la TRH regula las neuronas GABAérgicas de CA1 del hipocampo (Deng et al., 2006), la PPII pudiera controlar la acción de la TRH sobre la liberación de GABA al medio extracelular. Así, postulamos un tipo celular blanco adicional de la TRH en el circuito cortical, contribuyendo a los múltiples efectos de la TRH en esta región. Los resultados de la cuantificación de las células doblemente marcadas GAD65+/PPII+, tanto en las capas superficiales como en las capas internas, no revelaron alguna tendencia de concentración de la señal hacia alguna de las capas que conforman a la corteza; por lo tanto se puede concluir que la distribución de las células GAD65/PPII+ es además de abundante, homogénea.

Mientras que solo una pequeña fracción de neuronas GABAérgicas del hipocampo co-expresa el ARNm de la PPII, la casi totalidad de las neuronas GABAérgicas corticales están expresando la PPII, lo que podría estar relacionado a una variación importante en la extensión de la distribución de los receptores de la TRH en estas dos regiones. Como mencionamos anteriormente, el hipocampo presenta niveles muy limitados del ARNm de ambos receptores de la TRH y una notable densidad de sitios de unión de TRH detectados únicamente en el GD, la subregión que de manera consistente con estos datos, presentó la mayor cantidad de células GAD65+ y células doblemente marcadas GAD65+-PPII+ del hipocampo (Vargas-Orihuela, 2013). Sin embargo, aún queda pendiente definir si estas neuronas GAD65+-PPII+ de la corteza, expresan también algunos de los marcadores de tipo específico para neuronas GABAérgicas. De acuerdo con los datos publicados en Rudy et al., 2010, existen 3 grandes grupos de interneuronas GABAérgicas en la corteza, el grupo que expresa el ARNm de parvalbumina (PV) y representa el 40% de las células GABA corticales, el grupo definido por la expresión de somatostatina (SST) con el 30% de la población de GABA, y por último el grupo de neuronas definidas por la expresión del receptor de serotonina, el 5HT3aR, las cuales representan el otro 30% de la población total y conforman el grupo más grande de interneuronas GABAérgicas de las capas superficiales de la I a la III (Lee et al., 2010). Las neuronas GABAérgicas del grupo 5HT3aR, son sensibles también a acetil-colina, un neurotransmisor cuya liberación es a su vez, influenciada por la TRH (Giovannini et al., 1991; Prokai and Zharikova, 2002), y que es considerado un regulador esencial del procesamiento de la información que llega a estas células y que es requerido para llevar a cabo funciones cognitivas relacionadas con la plasticidad y durante el aprendizaje (Rudy et al., 2010).

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo dan algunas pistas importantes sobre cuál pudiera ser el papel que la PPII desempeña dentro de los circuitos involucrados en los procesos de aprendizaje en el hipocampo y de los poco conocidos pero importantes efectos de la TRH en la corteza cerebral. En las dos regiones estudiadas, los datos obtenidos hasta este momento indican que la expresión de la PPII es únicamente neuronal.

Consistente con los estudios previos de la distribución del ARNm del transportador vesicular de glutamato 1 (VGLUT1) (Ni et al., 1995), células ARNm VGLUT1+ fueron encontradas extensamente distribuidas a través del hipocampo, de manera prominente en las regiones de CA3, CA2, CA4 y el GD y con menor cantidad en CA1. En estas preparaciones, el ARNm de la PPII co-localizó con las células ARNm Vglut1+, de manera preferencial en CA3 y el GD. Los perfiles de ARNm VGLUT1+-PPII+ fueron encontrados dentro de las capas piramidal y granular del hipocampo y cuantificados (poner resultado de la cuantificación). Nuestros datos sugieren que algunos de los efectos del TRH sobre neuronas piramidales son controlados por la PPII expresada por estas células.

Resultados previos habían además demostrado que en el hipocampo una pequeña fracción de células PPII+ son neuronas GABAérgicas. Nuestros datos sugieren además que la localización del ARNm de la PPII en neuronas GABAérgicas no es excepcional del hipocampo, ya que un número importante de células PPII+ con fenotipo GABAérgico está presente en la corteza. En la corteza, la distribución típica de botones peri-sinápticos alrededor de neuronas piramidales sugiere además que una fracción significativa de las células PPII+ son neuronas piramidales.

Por lo tanto, nuestros datos muestran que la PPII se expresa en por lo menos dos tipos fenotípicos de neuronas en el hipocampo, neuronas glutamatérgicas (una mayoría) y neuronas GABAérgicas (la minoría). Esta dicotomía parece reproducirse en la neocorteza, si bien los datos que localizan a la PPII en neuronas glutamatérgicas de la neocorteza son todavía preliminares. Es posible que en otras regiones del sistema nervioso central exista una distribución análoga de la expresión de la PPII entre estos dos fenotipos neuronales.

## PERSPECTIVAS

Con base en la localización del ARNm y actividad de la PPII dentro de algunas regiones del cerebro analizadas en este trabajo, se generan algunos indicios de lo que pudiera ser su función fisiológica dentro del SNC. Son necesarios más experimentos y evidencias para afirmar de manera contundente si la enzima está relacionada con el control de la acción de la TRH en pruebas *in vivo*. Actualmente, los esfuerzos están dirigidos a inhibir la actividad de la PPII de manera específica; se ha podido observar en algunas de regiones cerebrales una prolongación y potenciación de los efectos a corto plazo de la TRH. Sin embargo, los efectos transitorios de esta inhibición, hacen imposible analizar su efecto sobre la acción de la TRH a largo plazo. A pesar de que desde el 2010 (Tang et al., 2010), se encuentra disponible un ratón *knockout* de la PPII, esta herramienta no ha sido utilizada todavía. Por otro lado, al silenciar la expresión del gen de la PPII de manera general en todo el organismo, se genera poca información para una región o proceso específico. Para enfrentar este reto, hemos comenzado por llevar a cabo un análisis anatómico de la distribución de la enzima para aclarar los fenotipos celulares que la expresan con la idea de desarrollar un ratón *knockout* PPII específico de un tipo celular particular, que nos permita la manipulación sitio específicos de la enzima y evaluar sus efectos a largo plazo. Experimentos adicionales, en los que definamos si las células positivas al ARNm de la PPII (PPII+) de un fenotipo celular identificado, co-expresan alguno de los receptores de la TRH, TRH-R1 o TRH-R2, serían útiles para aclarar si las neuronas que expresan a la PPII son o no, sensibles a la TRH.

- ✓ Al analizar si la expresión de los receptores de la TRH, TRH-R1 y TRH-R2, colocaliza con la expresión de PPII en el hipocampo. Lo cuál nos ayudaría a entender los sitios directos de acción del péptido, así como saber si la PPII podría estar regulando de forma directa la duración de los efectos producidos por la TRH en sus células blanco.
- ✓ Estandarizar la detección de dos marcadores neuronales en un mismo tejido, con anticuerpos secundarios acoplados distintos fluoróforos. Esto nos podría aclarar el tipo específico de neuronas GABAérgicas en las que se expresa la PPII, y por lo tanto, los mecanismos específicos en los que pudieran estar participando estas células.

- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., García-Vazquez, A., Ramírez- Amaya, V., Bermúdez- Rattoni, F., y Joseph- Bravo, P. 2007. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochemistry International*. 50: 404-417
- Atzori, M., Nistri, A. 1996. Effects of thyrotropin-releasing hormone on GABAergic synaptic transmission of the rat hippocampus. *Eur. J. Neurosci*. 8: 1299-1305
- Balschun, D., Moechars, D., Callaerts-Vegh., Vermaercke, B., Van Acker, N., Andries, L and D'Hooge, R. 2010. Vesicular Glutamate Transporter VGLUT1 Has a Role in Hippocampal Long-Term Potentiation and Spatial Reversal Learning. *Cerebral Cortex*. 20: 684-693
- Bauer, K. 1976. Regulation of degradation of thyrotropin releasing hormone by thyroid hormones. *Nature*. 259: 591-593
- Bauer, K. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochem Biophysics Res Commun*. 70: 69-74
- Bauer, K., Carmeliet, P., Baes, M y Deneef, C. 1990. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glia, and adenohypophyseal cells. *Endocrinology*. 127: 1224-1233
- Bauer, K. 1995. Inactivation of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) by the Hormonally Regulated TRH-Degrading Ectoenzyme. A Potential Regulator of TRH Signals?. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. (3): 101-105
- Bear M.F., Connors B.W y Paradiso M.A. Neuroscience: exploring the brain. 2a edition, Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins. 2001
- Braitman, D.J., Auker, C.R., Carpenter, D.O. 1980. Thyrotropin-releasing hormone has multiple actions in cortex. *Brain Res*. 194: 244-248
- Charli, JL., Cruz, C., Vargas MA y Joseph-Bravo, P. 1988. The Narrow Specificity Pyroglutamate Amino Peptidase Degrading TRH in Rat Brain is an Ectoenzyme. *Neurochemistry International*. 13 (2): 237-242
- Charli, J-L., Vargas, M. A., Cisneros, M., de Gortari, P., Baeza, M. A., Jasso, P., Pérez, L., Bourdais, J., Uribe, R. M., y Joseph-Bravo, P. 1998. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6: 45-57

- Charli, J.L., Pascual, I., Cruz, R y Vargas MA. 2006. Post-secretory inactivation of peptides in the hypothalamic-adenohypophyseal axis. Focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin releasing hormone inactivating ectoenzyme. *In: Joseph-Bravo, P, ed. Molecular endocrinology. Kerala, India: Research Signpost*
- Chávez-Gutierrez, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M.A., Matta-Camacho, E., Ducancel, F., Segovia, L., Joseph-Bravo, P., y Charli, J.L. 2005. A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity. *Journal of Neurochemistry*. 92: 807-817
- Cruz, R., Vargas, M.A., Uribe, R.M., Pascual, I., Lazcano, I., Yiotakis, A., Matziari, M., Joseph-Bravo, P., y Charli, J.L. 2008. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 29: 1953-1964
- Cummins, P.M., O'Connor, B. 1998. Review Pyroglutamyl peptidase: an overview of the three known enzymatic forms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1429: 1-17
- de Gortari, P., Fernández-Guardiola, A., Martínez, A., Cisneros, M y Joseph-Bravo, P. 1995. Changes in THR and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Research*. 679: 144-150
- de Gortari, P., Joseph-Bravo, P., Monroy-Ruiz, J., Martínez, A., Cisneros, M y Fernández-Guardiola, A.1998. Brain thyrotropin-releasing hormone content varies through amygdaloid kindling development according to after-discharge frequency and propagation. *Epilepsia*. 39: 897-903
- de Gortari, P., Méndez, M., Rodríguez-Keller, I., Pérez-Martínez, L y Joseph-Bravo, P. 2000. Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochemistry International*. 37: 483-496
- de Gortari, P., Romero, F., Cisneros, M y Joseph-Bravo, P. 2005. Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and mRNA levels in the rat limbic regions. *Neurochemistry International*. 46: 347-356
- de Gortari, P., Uribe, R.M., García-Vázquez, A., Aguilar-Valles, A., Martínez, A., Valdés, A., Charli, J.L., Fernández-Guardiola, A y Joseph-Bravo, P. 2006. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochemistry International*. 48: 31-42

- Deng, P.Y., Porter, J.E., Shin, H.S., y Lei, S., 2006. Thyrotropin-releasing hormone increases GABA release in rat hippocampus. *Journal Physiology*. 577(2): 497-511
- Fekete, C., Mihaly, E., Luo, L-G., Kelly, J., Clausen, J-T., Mao, Q., Rand, W-M., Moss, L-G., Kuhar, M., Emerson, C-H., Jackson, I-M y Lechan, R-M. 2002. 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*. 20: 9224-9234
- Freneau Jr, R.T., Voglmaier, S., Seal, R.P y Edwards R.H. 2004. VGLUTs define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. *TRENDS in Neuroscience*. 27(2): 98-103
- Erlander MG., Tillakaratne NJ., Feldblum DS., Patel, N y Tobin, AJ. 1991. Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron*. 7 (1): 91-100
- Esclapez M., Tillakaratne, N J.K., Tobin, AJ y Houser, C. 1993. Comparative Localization of mRNAs Encoding Two Forms of Glutamic Acid Decarboxylase With Nonradioactive In Situ Hybridization Methods. *The Journal of Comparative Neurology*. 331: 339-362
- Friedman, T.C., y Peng-Loh, Y., Cawley, N.X., Birch, N.P., Huang, S.S., Jackson, V.M.D., y Nillni, A.E. 1995. Processing of Pro-thyrotropin-Releasing Hormone (Pro-TRH) by Bovine Intermediate Lobe Secretory Vesicle Membrane PC1 y PC2 Enzymes. *Endocrinology*. 136(10): 4462-4470
- Giovannini, MG., Casamenti, F., Nistri, A., Paoli, F y Pepeu, G. 1991. Effect of thyrotropin releasing hormone (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis. *Br. J. Pharmacol*. 102: 363-368
- Gutiérrez-Mariscal, M., de Gortari, P., López-Rubalcava, C., Martínez, A y Joseph-Bravo. 2008. Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 33: 198-213
- Gutiérrez-Mariscal, M., Sánchez, E., García-Vázquez, A., Rebolledo-Solleiro, D., Charli, JL y Joseph-Bravo, P. 2012. Acute response of hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone neurons and thyrotropin release to behavioral paradigms producing varying intensities of stress and physical activity. *Regulatory Peptides*. 179: 61-70

- Heuer, H., Ehrchen, J., Bauer, K., y Schäfer, M.K.H. 1998. Region-specific expression of thyrotropin-releasing-hormone-degrading-ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *European Journal of Neuroscience*. 10: 1465-1478
- Heuer H, Schäfer MK, O'Donnell D, Walker P, Bauer K. 2000. Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol*. 428:319-36.
- Hökfelt, T., Tsuruo, Y., Ulfhake, B., Cullheim, S., Ardidsson, U., Foster, GA., Schultzberg, M., Schalling, M., Arborelius, L., Freedman, J., Post, C y Visser, T. 1989. Distribution of TRH-like Immunoreactivity with Special Reference to Coexistence with Other Neuroactive Compounds. *Section II. Synaptic Role of TRH. Annals New York Academy of Science*. 553: 76-105
- Horita, A., Carino, MA y Lai, H. 1986. Analeptic activity produced by TRH microinjection into basal forebrain area of the rat. *Fed. Proc*. 45: 795
- Horita, A. 1998. An Update on the CNS Actions of TRH and its Analogs. *Life Sciences*. 62(17/18): 1443-1448
- Hsieh, K. P., y Martin, T. F.1992. Thyrotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq y G11. *Molecular Endocrinology*. 6: 1673-1681
- Ishihara, K., Katsuki, H., Kawabata, A., Sasa, M., Satoh, M., Takaori, S. 1991. Effects of thyrotropin-releasing hormone and a related analog, CNK-602A, on long-term potentiation in the mossy fiber-CA3 pathway of guinea pig hippocampal slices. *Brain Research*. 554: 203-208
- Jaworska-Feil, L., Turchan, J., Przewłocka, B., Budziszewska, B., Leśkiewicz, M., y Lasoń, W. 1999. Effects of pilocarpine- and kainate- induced seizures on thyrotropin-releasing hormone biosynthesis and receptors in the rat brain. *J. Neural Transm*. 106: 395-407
- Joseph-Bravo, P., Charli, JL., Palacios JM y Kordon C. 1979. Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*. 104: 801-806
- Joseph-Bravo, P., Uribe, RM., Vargas, MA., Pérez-Martínez, L., Zoeller, T y Charli, JL. 1998. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell. Mol. Neurobiol*. 18: 231-247
- Joseph-Bravo, P. 2004. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone neurons as



transducers of energy homeostasis. *Endocrinology*. 145: 4813-4815

Joseph-Bravo P., Charli JL. 2007. El cerebro, la comunicación intercelular y los péptidos. *Biotecnología V14 CS3. indd*. 53-64

Kaneko, T., Fujiyama, F. 2002. Complementary distribution of vesicular glutamate transporters in the central nervous system. *Neuroscience Research*. 42: 243-250

Kaneko, T., Fujiyama, F y Hioki, H. 2002b. Immunohistochemical Localization of Candidates for Vesicular Glutamate Transporters in the Rat Brain. *The Journal of Comparative Neurology*. 444: 39-62

Kelly, J.A., Slator, G.R., Tipton, K.F., Williams, C.H and Bauer, K. 2000. Kinetic Investigation of the Specificity of Porcine Brain Thyrotropin-releasing Hormone-degrading Ectoenzyme for Thyrotropin-releasing Hormone-like Peptides. *The Journal of Biological Chemistry*. 275 (22): 16746-16751

Kelly, JA., Scalabrino, GA., Slator, GR., Cullen, AA., Gilmer, JF., Lloyd, DG., Bennett, GW., Bauer, K., Tipton, KF y Williams, CH. 2005. Structure-activity studies with high-affinity inhibitors of pyroglutamyl-peptidase II. *Biochem. J*. 389: 569-576

Knoblach, S.M., y Kubek, M.J. 1997. Changes in thyrotropin-releasing hormone levels in hippocampal subregions induced by a model of human temporal lobe epilepsy: Effect of partial and complete kindling. *Neuroscience*. 76: 97-104

Knoblach, S.M., y Kubek, M.J. 1997b. Increases in thyrotropin-releasing hormone messenger RNA expression induced by a model of human temporal lobe epilepsy: Effect of partial and complete kindling. *Neuroscience*. 76: 85-95

Kubek, M. J., Knoblach, S. M., Sharif, N. A., Burt, D. R., Buterbaugh, G. G., Fuson, K. S. 1993. Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann. Neurol*. 33: 70-76

Landry, CF., Watson, JB., Kashima, T y Campagnoni, AT. 1994. Cellular influences on RNA sorting in neurons and glia: an in situ hybridization histochemical study. *Molecular Brain Research*. 27: 1-11

Lazcano, I., Uribe, R.M., Martínez-Chávez, E., Vargas, M.A., Matziari, M., Joseph-Bravo, P., and Charli, J-L. 2012. Pyroglutamyl peptidase II inhibition enhances the analeptic effect of thyrotropin releasing hormone in the rat medial septum. *Journal of Pharmacology and*

*Experimental Therapeutics*. 342. No. 1: 222-231

Lechan, RM y Toni, R. 1992. Thyrotropin-releasing hormone neuronal system in the central nervous system. *In: Nemmeroff, C. ed. Neuroendocrinology. CRC Press, Boca Raton. 279-330*

Lee, S., Hjerling-Leffler, J., Zaghera, E., Fishell, G y Rudy, B. 2010. The Largest group of Superficial Neocortical GABAergic Interneurons Expresses Ionotropic Serotonin Receptors. *The Journal of Neuroscience*. 30 (50): 16796-16808

Low, WC., Roepke, J., Farber, SD., Hill, TG., Sattin, A y Kubek, MJ. 1989. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the hippocampal formation as determined by radioimmunoassay. *Neuroscience Letters*. 103: 314-319

Manaker, S., Winokur, A., Rosetene, W.H., Rainbow, T.C. 1985. Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *J. Neuroscience*. 5: 167-174

Mantyh, P.W y Hunt, S.P. 1985. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors. Localization by light microscopic autoradiography in the rat brain using [3H][3-Me-His2]TRH as the radioligand. *J. Neurosci*. 5: 551-561

Maskey, D., Kim, Hye-Jin., Kim Hyung Gun and Kim, Myeung. 2012. Calcium-binding proteins and GFAP immunoreactivity alterations in murine hippocampus after 1 month of exposure to 835 MHz radiofrequency at SAR values of 1.6 and 4.0 W/kg. *Neuroscience Letter*. 506: 292-296

Méndez, M., Joseph-Bravo, P., Cisneros, M, Vargas, MA y Charli, JL. 1987. Regional Distribution of In Vitro Release of Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain. *Peptides*. 8: 291-298

Metcalf, G y Jackson, LMD. 1989. Thyrotropin-releasing hormone: biomedical significance. *Ann NY Acad. Sci*. 553: 1

Morris, R. 1984. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Meth*. 11: 47-60

Ni, Binhui., Rosteck, Paul R., Nadi, Suzan N y Paul M S. 1994. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Neurobiology*. 91: 5607-5611

- Ni Binhui., Wu Xin., Yan Guang-Mei., Wang Jie y Paul, SM. 1995. Regional Expression and Cellular Localization of the Na<sup>+</sup> Dependent Inorganic Phosphate Cotransporter of the Rat Brain. *The Journal of Neuroscience*. 15(8): 5789-5799
- Nilni, E., Sevarino, K. 1999. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone derived peptides. *Endocrine Rev.* 20 (5): 599-648
- O'Connor, B y O'Cuinn, G. 1984. Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144: 271-278
- O'Dowd, B.F., Lee, D.K., Huang, W., Nguyen, T., Cheng, R., Liu, Y., Wang, B., Gershengorn, M.C y George, S.R. 2000. TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol. Endocrinol.* 14: 183-193.
- O'Leary, R., O'Connor, B. 1995. Thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurochemistry*. 65: 953-963
- O'Leary, R y O'Connor, B. 1995b. A Study of a Synaptosomal Thyrotropin Releasing Hormone-inactivating Pyroglutamate Aminopeptidase from Bovine Brain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 27 (9): 881-890
- Pascual, I., Gil Parrado, S., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., Díaz, J., Possani, LD., Charli, JL y Chávez, M. 2004. Purification of a specific inhibitor of pyroglutamyl aminopeptidase II from the marine annelide *Hermodice carunculata*: *in vivo* effects in rodent brain. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36: 138-152
- Paxinos G, Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. 2nd ed. New York: Academic Press
- Ponce, G., Charli, JL., Pasten JA., Aceves, C y Joseph-Bravo, P. 1988. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology*. 48: 211-213
- Ramírez-Amaya, V., Balderas, I., Sandoval, J., Escobar, ML y Bermúdez-Rattoni, F. 2001. Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J. Neurosci.* 21: 7340-7348
- Ramirez, M y Gutiérrez, R. 2001. Activity-dependent expression of GAD<sub>67</sub> in the granule cells

of the rat hippocampus. *Brain Research*. 917: 139-146

Rosen, JB., Abramowitz, J y Post, RM. 1992. Colocalization of TRH mRNA and Fos-like Immunoreactivity in Limbic Structures Following Amygdala Kindling. *Molecular and Cellular Neurosciences*. 4: 335-342

Rosen, JB., Cain, CJ., Weiss, SR y Post, RM. 1992b. Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin, and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brains. Res.* 15: 247-255

Rudy, B., Fishell G., Lee, S y Hjerling-Leffler, J. 2010. Three Groups of Interneurons Account for Nearly 100% of Neocortical GABAergic Neurons. *Developmental Neurobiology*. 71: 45-61

Sánchez, E., Uribe, RM., Corkidi, G., Zoeller, R-T., Cisneros, M., Zacarias, M., Morales-Chapa, C., Charli, JL y Joseph-Bravo, P. 2001. Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 74: 407-422

Sánchez, E., Vargas, M.A., Singru, P.S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J.L., y Lechan, R.M. 2009. Tanycyte Pyroglutamyl Peptidase II Contributes to Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis through Glial-Axonal Associations in the Median Eminence. *Endocrinology*. 150: 2283-2291

Sánchez, E., Charli, J.L., Lechan, R.M. 2013. Pyroglutamyl-peptidase II. In: Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen, editors, *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Oxford: Academic Press, pp. 414-419. ISBN: 978-0-12-382219-2. Elsevier Ltd., Amsterdam.

Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J., and Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91: 9534–9538.

Schomburg, L., Bauer, K. 1995. Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 136: 3480-3485

Schwarzer, C y Sperk, G. 1995. Hippocampal Granule Cells Express Glutamic Acid Decarboxylase-67 After Limbic Seizures in the Rat. *Neuroscience*. 69 (3): 705-709

Sloviter, RS., Dichter, MA., Rachinsky TL., Dean, E., Goodman, JH., Sollas, AL y Martin, DL.

1996. Basal Expression and Induction of Glutamate Descarboxylase and GABA in Excitatory Granule Cells of the Rat and Monkey Hippocampal Dentate Gyrus. *The Journal of Comparative Neurology*. 373: 593-618
- Stocca, G y Nistri, A. 1995. Enhancement of NMDA receptor mediated synaptic potentials of rat hippocampal neurones in vitro by thyrotropin-releasing hormone. *Neurosci. Lett*. 184: 9-12
- Stocca, G., Nistri, A. 1996. The Neuropeptide Thyrotropin-Releasing Hormone Modulates GABAergic Synaptic Transmission on Pyramidal Neurones of the Rat Hippocampal Slice. *Peptides*. 17: 1197-1202
- Sun, Y., Lu, X., Gershengorn, M. C. 2003. G protein-coupled receptor signalling in neuroendocrine systems. Thyrotropin-releasing hormone receptors-similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology*. 30: 87-97
- Swanson, LW y Cowan, WM. 1977. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Journal of comparative neurology*. 172: 49-84
- Tang, T., Li, L., Tang, J., Li, Y., Lin, W.Y., Martin, F., Grant, D., Solloway, M., Parker, L., Ye, W., Forrest, W., Ghilardi, N., Oravec, T., Platt, A.K., Rice, D.S., Hansen, G.M., Abuin, A., Eberhart, D.E., Godowski, P., Holt, K.H., Peterson, A., Zambrowicz, B.P y Sauvage, F.J. 2010. A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nature biotechnology*. 28(7): 749-755
- Torres, H., Charli, JL., González-Noriega, A y Vargas, MA. 1986. Subcellular Distribution of the Degrading Thyrotropin Releasing Hormone and Metabolites in Rat Brain. *Neurochemistry International*. 9 (1): 103-110
- Uribe, RM., Redondo, JL., Charli, JL y Joseph-Bravo, P. 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 58: 149-145
- van Strien, M.N., Cappaert, N.L.M and Witter, M.P. 2009. The anatomy of memory: an interactive overview of the parahippocampal- hippocampal network. *Nature reviews*. 10: 272-282
- Vargas, M., Mendez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P y Charli, JL. 1987. Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-

releasing hormone in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79: 311-314

Vargas-Orihuela, K.Y. 2013. Localización de la enzima que degrada a TRH, la piroglutamil peptidasa II (PPII) en el hipocampo de la rata adulta. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM. México, D.F.

Ziegler, D. R., Cullinan, W. E., y Herman, J. P. 2002. Distribution of Vesicular Glutamate Transporter mRNA in Rat Hypothalamus. *The Journal of comparative neurology.* 448: 217-229

## ANEXOS

### 1. Protocolo para producción a escala “midi-prep” mediante el método de QIAGEN “plasmid Midi kit” para plásmidos con alto número de copias (20-100 µg)

A partir de cultivos de 5ml de LB/ 5µl de ampicilina (200 µg/ml) con inóculo de bacterias DH5α competentes transformadas mediante electroporación con el plásmido pSPT19-PPII que fueron incubados por 12 horas a 37°C y agitación de 200rpm, se tomaron 500µl y se inocularon 100 ml de medio LB/ 100µl de ampicilina (200 µg/ml) que se dejó incubando durante 12 horas a 37°C y agitación de 200rpm. Una vez cumplido el lapso de incubación y el medio se tornó turbio, fue almacenado a 4°C para detener el crecimiento.

Se vierte el cultivo en 1 tubo de centrifuga de 30 ml estéril y se centrifuga durante 15 min a 4°C a 7,000 rpm para obtener el pellet de bacterias.

Nota: Ya que los tubos de centrifuga son de 30ml se debe desechar el sobrenadante y agregar de nuevo cultivo repitiendo las veces necesarias hasta haber centrifugado los 100ml del cultivo y obtener un solo pellet que debe ser almacenado durante 2 días a -20°C para mejorar el rendimiento del plásmido.

Se resuspende el pellet de bacterias en 4 ml de buffer P1 (buffer de dilución con RNAsa, almacenado a 4°C).

Se agregan 4 ml de buffer P2 (buffer de lisis), se mezcla vigorosamente invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces y se deja incubando por 5 min en esta solución (no exceder del tiempo y no dar vórtex, el contenido comienza a verse viscoso).

Se adicionan 4 ml de buffer P3 (buffer de neutralización), se mezcla invirtiendo el tubo de 4 a 6 veces y se mantiene en hielo durante 15 min. (para un mejor resultado enfriar el buffer P3 previamente).

Centrifugar a 13,000 rpm's por 30 min a 4°C (para la centrifuga del pasillo se usa el rotor JA 20). Remover el sobrenadante que es el que contiene el plásmido se centrifuga de nuevo con las mismas condiciones que la primera vez pero durante 15 min.

Equilibrar la columna QIAGEN-tip 100 (No. Cat. 1011713) haciéndole pasar 4 ml de buffer QBT dejando que el buffer pasé a través de ella por gravedad (este buffer contiene un detergente que disminuye la tensión superficial sobre la resina lo que mejora el paso del sobrenadante).

Nota: La columna se pone sobre un matraz con la ayuda de las argollas de plástico que la sostienen en la superficie del matraz.

Aplicar a la columna el sobrenadante recuperado y dejar que atraviese la resina por gravedad. Lavar la columna 2 veces con 10 ml de buffer QC (el flujo que atraviesa la columna y es colectado en un matraz y se desecha).

Eludir el DNA de la columna agregando 5 ml de buffer QF colectando en tubos falcon de 50 ml (medida para que embone con la columna) y hacer alícuotas de 1ml en tubos eppendorf de 2ml para microcentrífuga. La precipitación del DNA se realiza agregando 0.7 volúmenes de isopropanol a 5 ml de DNA recuperado, mezclar y centrifugar inmediatamente a 11,000 rpm's durante 30 min a 4°C. Decantar el sobrenadante cuidadosamente.

Nota: Si los 5 ml de DNA eluído se pasan a tubos eppendorf cada uno tendrá un volumen de 1ml de DNA y los siguientes reactivos deben ser agregados de forma proporcional a este volumen. Por ejemplo si se deben agregar 3.5 ml totales de isopropanol para 5 ml de DNA, cada tubo llevará 700µl de isopropanol ( $700\mu\text{l} \times 5 = 3,500\mu\text{l}$ ).

Lavar el pellet de DNA con 2ml totales de etanol al 70% a T°A (cada tubo llevará 400µl de etanol al 70%) y centrifugar a 13,500 rpm's por 10 min a T°A. Decantar el sobrenadante cuidadosamente con la ayuda de una micropipeta para absorber el líquido restante sin tocar el pellet.

Secar el pellet por 10 min a T°A y resuspender 200µl de buffer TE pH 8 o Tris Cl 8.5 (lavando



también las paredes del tubo) y juntar el volumen resuspendido de cada pellet en 1 solo tubo.

Determinar la concentración de ácido nucléico en un espectrómetro nanodrop y correr un gel de agarosa a 1% con 1µg de DNA para verificar el tamaño y calidad de la sonda; usar un marcador de peso molecular tipo IV.

**2. Protocolo para la linearización de los plásmidos utilizados para la hibridación *in situ***

Para llevar a cabo los ensayos de hibridación *in situ* fue necesario linearizar 20 µg de plásmido pSPT19-PPII, durante 4 horas a una temperatura de 37 °C, usando 20 unidades de la enzimas de restricción EcoR1 (New England Biolabs Inc. 20,000 U/ml) en 10 µl de buffer NE4 10X y H2 O-ISH hasta completar un volumen final de 100 µl.

Este plásmido fue generado por la subclonación de un fragmento de 676 pb que corresponde a los nucleótidos 129 a 773 del ADNc de la enzima PPII en el vector de transcripción *in vitro*. La clonación se realizó entre los promotores de la ARN polimerasa T7 y SP6 y estas enzimas se utilizaron en forma respectiva para producir el ARNc antisentido (ver imagen 29).

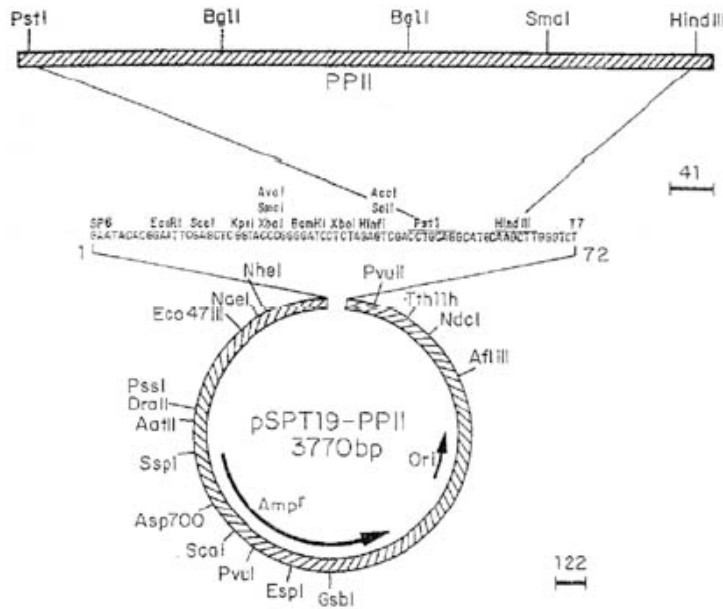


Figura 29. Plásmido pSPT19-PPII. Se muestran los sitios de restricción que contiene y los sitios en los que está insertada la secuencia de bases de la PPII.

La purificación de los plásmido linealizado se realizó mediante un proceso de extracción 1:1 v/v de fenol: cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), centrifugación rápida de 5 min a 7000 rpm a temperatura ambiente, 1 vol. de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, de nuevo centrifugación rápida de 5 min a 7000 rpm a temperatura ambiente, una precipitación con 1/25 de volúmen de NaCl 5M y 2 volúmenes de etanol absoluto frio, que fueron precipitados durante 12 horas a -20 °C, transcurrido el tiempo, se llevó a cabo una centrifugación de 30 min a 13,500 rpm a 4 °C, seguida por un lavado en etanol al 75% de 5 min a 4 °C, los tubos se dejaron secando durante 10 min a temperatura ambiente antes de resuspender el pellet con el DNA en 20µl H<sub>2</sub>O-miliQ. La concentración final del plásmido fue determinada por cuantificación en un nanodrop (a 260 nm). Antes de llevar a cabo la transcripción *in vitro*, se corrió un gel de agarosa al 1% con 1 µg del plásmido purificado para verificar que las enzima de restricción hubiera linealizado por completo al plásmido.

Un resumen del procesamiento del plásmido de la PPII hasta su transcripción *in vitro* es presentadp en el esquema de la figura 30.

### Clonación de plásmidos y marcaje de transcritos de cRNA con <sup>35</sup>S-UTP o digoxigenina.

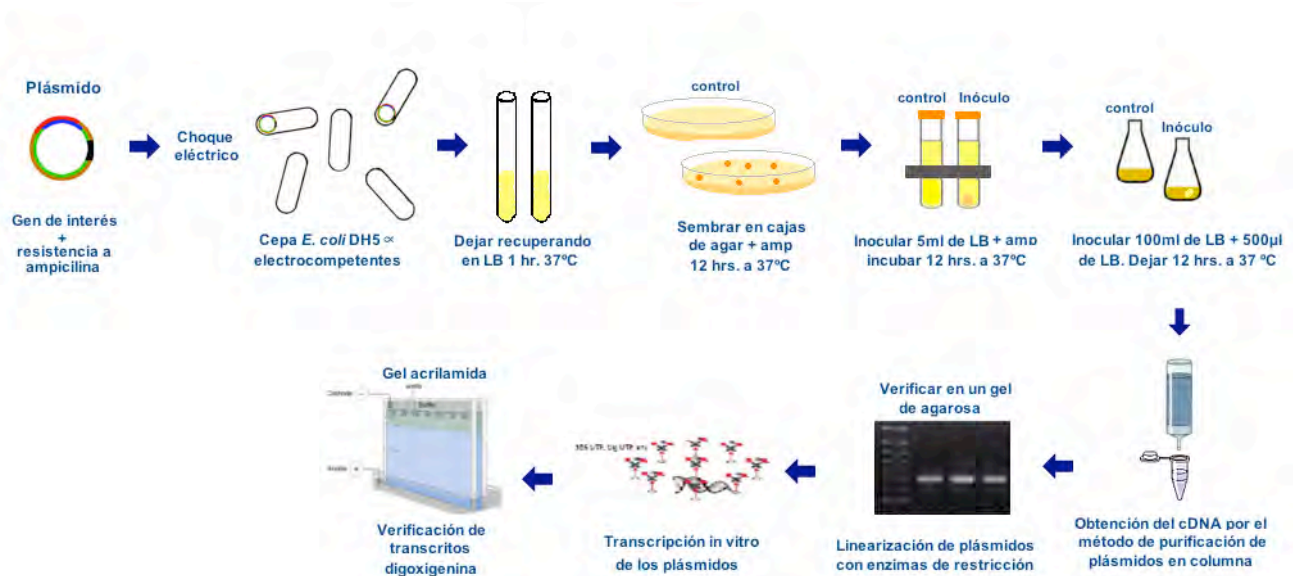


Figura 30. Esquematación del proceso metodológico para la clonación de plásmidos y el marcaje de transcritos de ARNc con radioactividad o digoxigenina; así como la determinación de la eficiencia de la transcripción *in vitro*.

### **3. Detección de la incorporación de la digoxigenina 11 $\alpha$ -UTP a los transcritos durante la transcripción *in vitro***

Para determinar la eficiencia de incorporación de la digoxigenina 11  $\alpha$ -UTP a las sondas de ARNc de GAD65 y VGLUT-1, los transcritos fueron analizados por electroforesis en un gel de acrilamida al 6% en condiciones desnaturizantes. Se usó TBE 1X, 10  $\mu$ l de TEMED y 100  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10% para inducir la polimerización de la acrilamida. Se usó 1  $\mu$ l de cada transcrito que antes de ser cargado al gel fue desnaturizado por 15 minutos a 65°C e inmediatamente colocado en hielo; después de correr las muestras durante 1 hora a 400 volts, se realizó la transferencia de los transcritos marcados a una membrana de nylon (marca Schleider & Schuell, BioScience) usando papeles Wattman de 3 mm, empapados en soluciones las ánodo 1 (Tris 0.3 M pH 10.4 + metanol al 20%), ánodo 2 (Tris 25 mM pH 10.4 + metanol al 20%) y cátodo (2.62g de ácido caprónico en 500 ml de H<sub>2</sub>O- miliQ, pH 9.4) cuidando de no dejar burbujas de aire entre ellos, y colocados en una cámara *Semi-dry Blotting* a 45 amperes durante 45 min. Antes de realizar la detección de los transcritos, las muestras transferidas, fueron fijadas a la membrana de nylon con luz UV (1,200 Joules) durante 3 minutos.

La detección de los transcritos marcados se hizo empleando un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina, para lo cual la membrana de nylon fue lavada en *buffer* B (Tris HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) durante 5 minutos a T<sup>°</sup>A, por 10 minutos en solución de bloqueo al 5%/ PBS 1X a T<sup>°</sup>A e incubada con el anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina diluido en *buffer* A (Tris HCl 100mM pH 7.6, NaCl 100 mM + Tritón 0.3%, BSA 1%), en una concentración 1:5000 por 5 minutos a T<sup>°</sup>A. Por último, se realizó 1 lavado por 5 minutos a T<sup>°</sup>A en *buffer* B (Tris HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) y se

reveló la fosfatasa con 45  $\mu$ l de NBT, 35  $\mu$ l X-P por cada 10 ml de este *buffer*, agitando en la oscuridad parcial, en el momento en que las bandas correspondientes a los transcritos GAD65-dig (de 628 pb y 824 pb cada uno) se hicieron visibles en la membrana de nylon, la reacción fue detenida en *buffer* B.

#### **4. Hidrólisis alcalina de la sonda GAD65 y VGLUT-1 digoxigenina 11 $\alpha$ -UTP por el método de buffer de carbonatos**

El tiempo de la reacción de hidrólisis fue determinado por la fórmula  $t = (L_0 - L_f) / k L_0 L_f$

Donde t es el tiempo de reacción en minutos

$L_0$  es el tamaño inicial de la sonda (en Kb)

$L_f$  es el tamaño de la sonda final

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

Se tomaron 20  $\mu$ l de cada transcrito marcado a los cuales se les adicionaron 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-ISH y 40  $\mu$ l de buffer de carbonatos (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.06 M, NaHCO<sub>3</sub> 0.04 M pH 10.2). Cada tubo con la reacción, se dejó incubar a 60°C durante el tiempo determinado con la fórmula. Una vez transcurrido el tiempo de hidrólisis, se detuvo la reacción colocando el tubo en hielo y adicionando inmediatamente 80  $\mu$ l de buffer de neutralización (NaOAc 0.2 M pH 4, ácido acético al 1%, ajustando a pH 6 con H<sub>2</sub>O-ISH) + 5  $\mu$ l de ARNt 10mg/ml y 240  $\mu$ l de etanol absoluto frío. En esta solución se dejaron precipitando durante 1 hora a -70°C y se realizó la recuperación de transcritos mediante centrifugación por 30 minutos a 4°C a 13,500 rpm's, se aspiró el sobrenadante y se dejaron secar las pastillas durante 10 minutos a T<sup>o</sup>A, finalmente ambas pastillas con los pequeños fragmentos de los transcritos GAD-65- digoxigenina hidrolizados se resuspendieron en 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-ISH y congelados a -20°C hasta su uso.