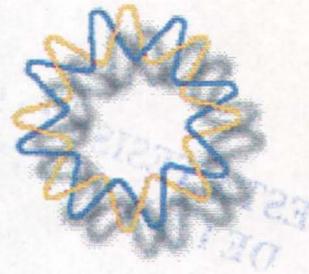




00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Activación de las neuronas TRHérgicas en hipocampo de ratas
entrenadas en el laberinto de Morris**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA
BIOL. ARGEL AGUILAR VALLES**

CUERNAVACA, MORELOS

2005

m342282

AGUILAR VALLES, ARGEL



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular bajo la dirección de la Dra. Patricia I. Joseph Bravo con el apoyo de la DGAPA (IN-222603) y CONACyT (MRI35896N). Para la realización de la maestría se contó con las becas de postgrado del CONACyT y DGEP.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Argel Aguilar

Valles

FECHA: 17-03-05

FIRMA: 

Directora de Tesis

Dra. Patricia I. Joseph Bravo

Comité Tutorial

Dra. Susana López Charretón

Dr. Enrique Merino Pérez

Dra. Patricia I. Joseph Bravo

Jurado de Examen

Presidente	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Secretario	Dra. Patricia I. Joseph Bravo
Vocal	Dr. Gabriel Roldán Roldán
Suplente	Dra. Susana Castro Obregón
Suplente	Dr. Gustavo Pedraza Alva

*"Happiness is nothing more than good health and a bad memory."
Albert Schweitzer*

*"Memory is a complicated thing, a relative to truth, but not its twin."
Barbara Kingsolver*

*"El pensamiento de uno, por mezquino que sea, en tanto que está en un, es siempre más profundo; una vez expresado es siempre más ridículo y más desleal."
F. Dostoyevski
El Adolescente*

Agradezco la colaboración y apoyo técnico de:

Isaraela Balderas, Jimena Sandoval, Víctor Ramírez-Amaya, Edith Sánchez y Patricia de Gortari, cuya participación en la planeación y realización del proyecto ha sido fundamental.

Q.I. Fidelia Romero Arteaga por su apoyo en los RT-PCRs.
Q.F.B. Miguel Cisneros en la realización de los radioinmunoensayos.

La Unidad de Síntesis del IBt (UNAM):
M.en C. Eugenio López Bustos
Paul Gaytán

Manuel Villa y Doña Elena Martell indispensables para el mantenimiento cotidiano de las condiciones de trabajo en el laboratorio.
Miguel Olvera por su apoyo en los asuntos administrativos.

A los Dres. Rosa Ma. Uribe, Antonieta Cote, Jean-Louis Charli, Susana López y Enrique Merino por todo el apoyo brindado y el interés en el proyecto.

A la Gran Jefa Patricia Joseph, por todo en los últimos 4 años.

A mis compañeros del laboratorio: Ray, Lucia, Carlos, Martha, Vicenta, los 3 Migueles, Miriam, Daniela, Edna, Edith, Mariana, Iskra.

Dedicada a:

Margarita (la mamá), Francisco (el papá)

A Malí y Grecia (LA SOBRINA!!!!!!!!!!!!!!).

A P. Joseph

Al George, la Róxio, la Dení.

A mis tíos, primos y compañía: Felipe (grande), Leti, Felipe (CHICO), Abraham, Sandra, Manuel, Luis (Oso), Carlos, la Tía Julia, la Tía Luisa, Clara (Osa), Luis (Osezno).

A la Iskra (Butroskaya), Mariana, la Blanche, la Margara, Laura (Roomy), la Chofa, el Juanete y el harem: Vania, Karla, Ilse y Elizabeth.

A Edna y Magalíííí (antiespecie).

Y aunque ni se enteren, a mis amiguitos la escuelita de Chema Delgado.

A Gabino B., Pablo de Olavide y Flora Tristán.

ÍNDICE

I.	LISTA DE ABREVIATURAS	3
II.	RESUMEN	5
III.	INTRODUCCIÓN	6
	A. MEMORIA Y APRENDIZAJE	6
	B. EL APRENDIZAJE ESPACIAL Y EL LABERINTO DE MORRIS ...	9
	C. EL ESTRÉS Y EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL ..	11
	D. LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)	13
IV.	HIPÓTESIS	20
V.	OBJETIVOS	20
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
	A. ENTRENAMIENTO	21
	B. SACRIFICIO DE LAS RATAS Y DISECCIÓN DEL TEJIDO	22
	C. RADIOINMUNOENSAYOS	22
	D. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL	24
	E. CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL	24
	F. RT-PCR	25
	G. HIBRIDACIÓN <i>IN SITU</i>	26
	H. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO	27
	I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
VII.	RESULTADOS	29
	A. OPTIMIZACIONES METODOLÓGICAS	29
	1. RT-PCR SEMI-CUANTITATIVA	29
	B. ENTRENAMIENTO EN EL LABERINTO DE MORRIS	32
	C. CAMBIOS DE LA EXPRESIÓN DE ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN TRHÉRGICA ASOCIADOS A LA TAREA ESPACIAL.....	33
	2. TRH	34
	3. TRH R1	37
	4. TRH R2	43

5.	PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II (PPII)	45
D.	GLUCOCORTICOIDES EN SUERO Y RNAm DEL RECEPTOR DE GLUCOCORTICOIDES (GR) EN HIPOCAMPO.....	47
6.	CORTICOSTERONA.....	47
7.	GR.....	48
E.	CORRELACIONES CON PARÁMETROS CONDUCTUALES Y DEL ESTRÉS.....	49
VIII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	52
F.	LOS CAMBIOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y EN LOS ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN TRHÉRGICA	52
G.	FUNCIONES DISTRIBUIDAS EN EL EJE SEPTO-TEMPORAL DEL HIPOCAMPO.....	59
IX.	BIBLIOGRAFÍA	62

I. LISTA DE ABREVIATURAS

7: núcleo facial	DEPC: dietil-pirocarbonato
AC: adenilato ciclasa	DG o GD: giro dentado
ACTH: corticotropina	DM: núcleo dorsomedial del hipotálamo
AHA: núcleo anterior del hipotálamo	DNA: ácido desoxiribonucleico
Amb: núcleo ambiguo	DNAc: DNA complementario
AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico	DNAdc: DNA de doble cadena
AMPc: adenosil monofosfato cíclico	DTM: núcleo dorsal tuberomamilar
AOB: bulbo olfatorio accesorio	DTT: ditiotreitól
AP: área postrema	EDTA: ácido etilendiaminotetracético
ATg: núcleo tegmental anterior	GABA: ácido γ -amino-butírico
BDNF: factor neurotrófico derivado del cerebro	GC: glucocorticoides
BL: núcleo basolateral amigdalóide	Gl: capa glomerular del bulbo olfatorio
BLAST: herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales	GR: receptor de glucocorticoides
BST: núcleo basal de la estría terminal	GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides
CA1: cuerno de Amón 1	HDB: banda diagonal de Broca, brazo horizontal
CA2: cuerno de Amón 2	HPA: eje hipotálamo-pituitaria-adrenal
CA3: cuerno de Amón 3	IP ₃ : inositol trifosfato
CA4: cuerno de Amón 4	LA: núcleo latero-anterior del hipotálamo
CM: núcleo centro medial del tálamo	LD: núcleo laterodorsal del tálamo
Cpu: caudado putamen	LS: <i>septum</i> lateral
CRE: elemento de respuesta a AMPc	LTD: depresión a largo plazo
CRH: hormona liberadora de corticotropina	LTP: potenciación a largo plazo
CT: corticosterona	ME: eminencia media
Cu: núcleo cuneado	Me: núcleo medial amigdalóide
DAG: diacil-glicerol	MG: núcleo geniculado medial
	MHb: habénula medial
	MnR: núcleo mediano de rafe

MPA: área pre-óptica medial	RT: transcripción reversa
MR: receptor a mineralocorticoides	Rt: núcleo reticular del tálamo
MVe: núcleo vestibular medial	RXR: receptor del retinoide X
NMDA: N-metil-D-aspartato	S o Sub: subículo
NPV o Pa: núcleo paraventricular del hipotálamo	SC: colículo superior
ON: núcleo olfatorio	SCh: núcleo supraquiasmático
PAM: monooxigenasa α – amidante de la peptidilglicina	SHy: núcleo septohipotalámico
PBS: amortiguador salino de fosfatos	siRNA: RNA interferente pequeño
PCR: reacción en cadena de la polimerasa	SNC: sistema nervioso central
PIP ₂ : fosfoinositol bifosfato	Sp5: núcleo espinal trigeminal
Pir: corteza piriforme	T3: triyodotironina
PKA: fosfocinasa A	T4: tetrayodotironina
PKC: fosfocinasa C	TR: receptor de hormona tiroidea
PLC: fosfolipasa C	TRE: elemento de respuesta a hormona tiroidea
Pn: núcleo del puente	TRH: hormona liberadora de tirotropina
PPII: piroglutamil peptidasa II	TRH R1: receptor 1 del TRH
proTRH: precursor del TRH	TRH R2: receptor 2 del TRH
PV: núcleo paraventricular del tálamo	TrkB: cinasa B relacionada a la tropomiosina
RMg: núcleo magno del raquídeo	TSH: tirotropina
RNA: ácido ribonucleico	UTP: uracil trifosfato
RNAm: RNA mensajero	VCP: núcleo ventral coclear
ROB: núcleo oscuro del raquídeo	VP: núcleo ventroposterior del tálamo

II. RESUMEN

El TRH induce un incremento en el tiempo de vigilia y mejora el desempeño en tareas de aprendizaje. Al activar neuronas TRHérgicas del sistema límbico incrementa el metabolismo del péptido; postulamos que la detección de estas variaciones permite inferir la participación de neuronas TRHérgicas en una función. Analizamos la posibilidad de que el TRH participe en procesos de aprendizaje mediante la cuantificación del péptido y los RNA mensajeros del proTRH, sus receptores (R1 y R2) y la enzima inactivante PPII en el hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto de Morris. Para discriminar los efectos del estrés se cuantificaron la corticosterona sérica y el RNAm del receptor a glucocorticoides (GR). Se entrenaron ratas con o sin plataforma (controles de nado) en el laberinto por 1, 3 ó 5 días y se sacrificaron 5, 30 ó 60 minutos después del 10° ensayo; el hipocampo fue separado en las regiones anterior y posterior. La concentración de corticosterona circulante fue más alta al primer día y disminuyó al quinto; la cantidad del RNAm del GR mostró cambios en sentido opuesto en el hipocampo posterior, pero no en el anterior. En los animales entrenados el primer día hubo incrementos transitorios del R2 (74%) y la PPII (75%). Al tercer día incrementaron R2 (312%) y R1 (108%) y disminuyó el proTRH (48%). Después de cinco días, disminuyeron transitoriamente los dos receptores en la zona anterior ($\approx 56\%$) e incrementó 2.50 veces el TRH; en la posterior incrementaron el proTRH (69%) y R1 (48%) y disminuyó el TRH (27-40%) (comparados a los controles de nado). La expresión diferencial de los RNAm y el TRH sugiere la participación del péptido en procesos de aprendizaje espacial y coincide con variaciones en la expresión de la neurotrofina BDNF y su receptor, implicados en el aprendizaje.

III. INTRODUCCIÓN

A. MEMORIA Y APRENDIZAJE

Una definición de aprendizaje es la adquisición de nueva información debido a un evento o estímulo que pueden ocurrir al exterior o al interior del organismo (Abel y Lattal, 2001; Kim y Baxter, 2001; Sweatt, 2003). Durante el aprendizaje los patrones espacio-temporales de actividad neuronal, que representan a los eventos que están ocurriendo, causan cambios en la “fuerza” de las conexiones sinápticas dentro algunas zonas del cerebro; esto se conoce como plasticidad sináptica dependiente de la actividad (Sweatt, 2003, Morris, et al, 2003). La reactivación de las sinapsis modificadas causa patrones de disparo en las neuronas que constituyen la experiencia subjetiva de la memoria o la expresión, en el comportamiento, de los cambios aprendidos (los cuales no pueden atribuirse a la modificación de la capacidad de percepción o de movimiento del organismo) (Abel y Lattal, 2001; Kim y Baxter, 2001; Morris, et al, 2003; Sweatt, 2003). Esta es la hipótesis general de plasticidad sináptica que subyace el estudio de la memoria.

La formación de la memoria involucra entonces dos procesos: codificación y almacenamiento. La codificación se refiere al proceso de representación de nueva información, mediante patrones de disparo (trazas) de las neuronas en zonas específicas del cerebro. La consolidación de la traza debe ocurrir para la formación de la memoria (Goshen-Gottsein, 2001; Morris, et al, 2003).

Son varios sistemas los que funcionan en la codificación y consolidación de distintos tipos de información (Kim y Baxter, 2001; White y McDonald, 2002). Biológicamente un sistema implicado en memoria comprende al circuito neuronal que opera con un tipo particular de información y que participa en su almacenamiento (Kim y Baxter, 2001).

En los humanos el sistema de memoria explícita o declarativa está involucrado en el procesamiento de información sobre eventos autobiográficos (memoria episódica) y con la habilidad de adquirir y recordar hechos acerca del mundo que no están necesariamente relacionados con la experiencia personal (memoria semántica) (Susuki y Clayton, 2000). El circuito asociado a la memoria semántica incluye a las cortezas entorinal, peririnal y parahipocampal (Susuki y Clayton, 2000).

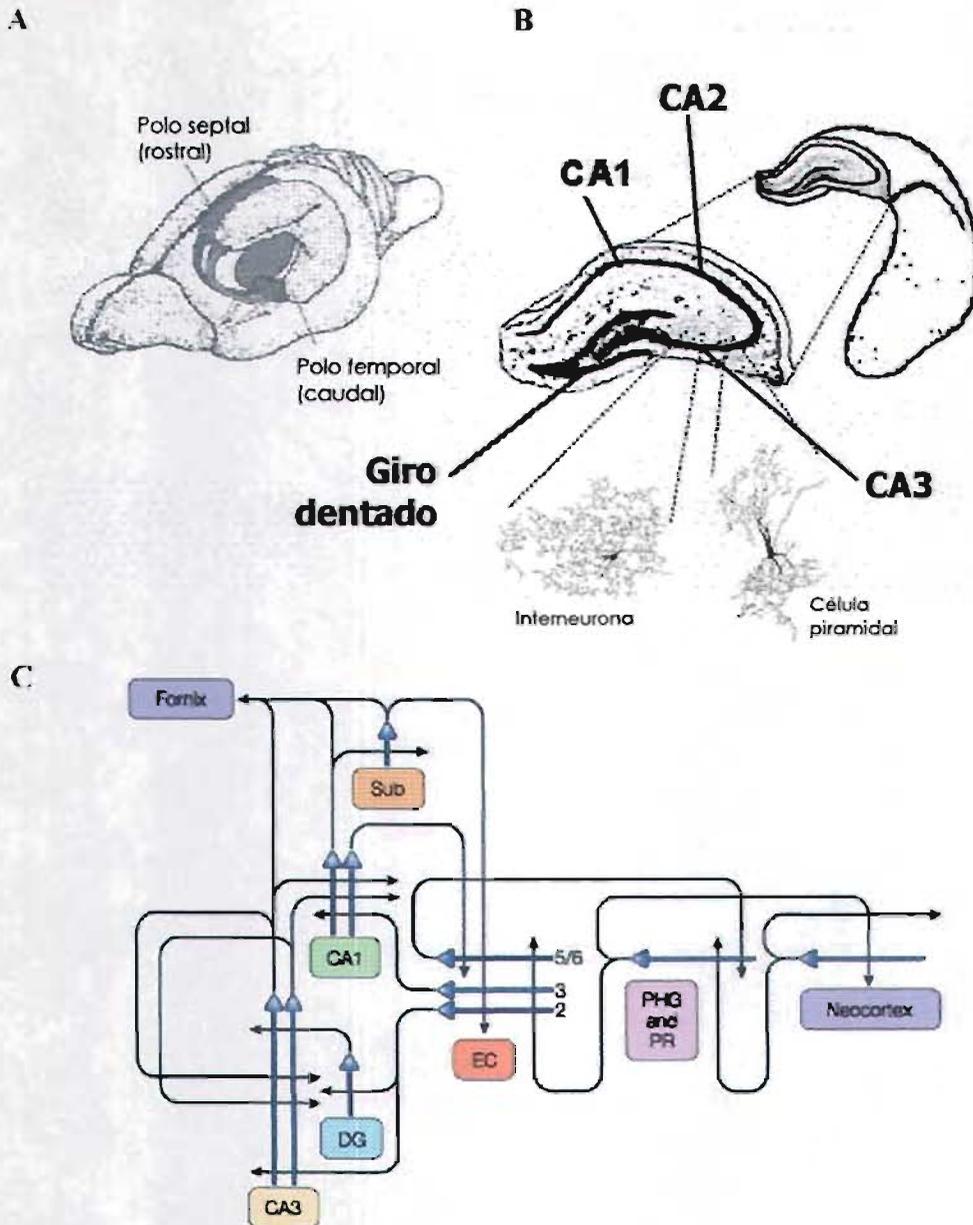
En los primates y los roedores la formación hipocampal es esencial en el procesamiento cognitivo (de información espacial, de aprendizaje dependiente del tiempo [orden de eventos] y otras asociaciones complejas) y en la consolidación de memorias de tipo episódico y espacial, si bien se postula que no es el sitio de su almacenamiento a largo plazo (Kandel, et al, 1995; Suzuki y Clayton, 2000; Abel y Lattal, 2001; D'Hooge y De Deyn, 2001).

La formación hipocampal en los roedores es una estructura alargada cuyo eje longitudinal tiene forma de una C. Se extiende desde el *septum* en el cerebro basal anterior (zona rostro – dorsal), rodea al diencéfalo y termina en la zona temporal (porción caudo – ventral) (Figura 1A) (Amaral y Witter, 1995). Comprende seis regiones con citoarquitectura distintiva: el giro dentado, el hipocampo propiamente dicho (formado por los dominios CA1, CA2 y CA3), el subículo, el presubiculo, el parasubiculo y la corteza entorinal (Figura 1C) (Amaral y Witter, 1995).

El hipocampo recibe aferencias directas o indirectas de todas las áreas sensoriales de la corteza (visual, auditiva y somatosensorial), y además una entrada directa del sistema olfativo vía el bulbo olfatorio (Sweatt, 2003). Toda la información sensorial llega a través de las cortezas peririnal y entorinal (ubicadas en la vecindad del hipocampo, cerca de la fisura rinal), de las cuales salen axones que proyectan al giro dentado (la vía perforante) y a los dominios CA (Figura 1C) (Sweatt, 2003).

Los dominios CA están compuestos en un 90% de neuronas piramidales glutamatérgicas (Figura 1B); las de CA1 proyectan de regreso a la corteza entorinal (algunos axones hacen relevo en el complejo subicular, otros llegan directamente a dicha corteza) (Figura 1C) (Sweatt, 2003). Además de las proyecciones hipocampo-corticales, CA1 y CA3 proyectan (a través del fórnix) a regiones como los cuerpos mamilares, el *septum* lateral y la amígdala (Figura 1C) (Sweatt, 2003).

El hipocampo también recibe proyecciones moduladoras relativamente difusas del tallo cerebral; algunas del tipo noradrenérgico (del *locus coeruleus*) y serotoninérgico (de los núcleos del rafé) (Sweatt, 2003). Las funciones del hipocampo también están reguladas por inervaciones colinérgicas provenientes de del *septum* medial y el brazo vertical de la Banda Diagonal de Broca (Ikonen, 2001).



Nature Reviews | Neuroscience

Figura 1. La formación hipocampal. A) Ubicación de la formación hipocampal en el cerebro de la rata. B) Amplificación del hipocampo en la que se muestra la apariencia de una sección coronal. C) El circuito hipocampal mostrando las principales proyecciones de las neuronas de cada región. Sub: subículo; DG: giro dentado; EC: corteza entorinal; PHG: giro parahipocampal; PR: corteza peririnal (tomado de Nakazawa, et al, 2004).

En la formación hipocampal se han identificado una serie de cambios que correlacionan con la codificación y consolidación de la memoria y con el proceso de recordar (por ejemplo, el ritmo θ en la actividad exploratoria, las células de lugar ("place

cells”), la potenciación a largo plazo [LTP], la depresión a largo plazo [LTD], cambios en la estructura de las espinas dendríticas, neurogénesis, etc.) (Sweatt, 2003).

B. EL APRENDIZAJE ESPACIAL Y EL LABERINTO DE MORRIS

El aprendizaje espacial es aquel que permite a los animales navegar en su ambiente. determinar la posición de objetos y eventos y, si es el caso, las rutas que les permiten alcanzarlos (Suzuki y Clayton, 2000; D’Hooge y De Deyn, 2001). En la naturaleza, las ratas restringen la mayor parte de su actividad a una zona limitada donde se encuentra el nido (Save y Poucet, 2005), pero deben explorar más allá de este espacio para buscar y obtener agua, comida y congéneres, por lo que su supervivencia depende de la habilidad para memorizar lugares y de emplear estrategias conductuales que les permitan navegar eficientemente entre estos sitios y el nido (Save y Poucet, 2005).

Muchos autores han presentado evidencia del papel específico del hipocampo en la formación de la memoria espacial (D’Hooge y De Deyn, 2001; Moser, et al, 1993). Registros electrofisiológicos en CA1 y CA3 (que también se han descrito en la corteza entorinal, el giro dentado y el subículo) muestran que las células piramidales disparan sólo cuando el animal se encuentra en áreas específicas en un ambiente (la células de lugar) (O’Keefe y Dostrovsky, 1971). Miles de células de la formación hipocampal disparan de acuerdo a la localización de la rata en cierto espacio. Al computar la información obtenida de las células individuales, el hipocampo puede, a través de un mecanismo desconocido, determinar la posición exacta de la rata en el ambiente (Wilson y McNaghton, 1993; Ikonen, 2001). Se ha sugerido que las “células de lugar” del hipocampo son el sustrato primario que subyace la navegación espacial en el aprendizaje de la tarea en el laberinto de Morris (D’Hooge y De Deyn, 2001).

El laberinto de Morris es una tarea que depende del hipocampo; en ella ratas o ratones aprenden escapar del agua al ubicar, usando pistas visuales que rodean al tanque, una plataforma escondida (Figura 2) (Myhrer, 2003), el escape del agua funciona como reforzamiento positivo (Crawley, 2000).

El laberinto de Morris aprovecha la habilidad natural de las ratas para nadar (Save y Poucet, 2005); además es sensible a la detección y medición de deficiencias cognitivas (Myhrer, 2003), ya que fue diseñado para identificar las estructuras anatómicas requeridas

en el aprendizaje espacial (Crawley, 2000). Los resultados más consistentes se han obtenido con lesiones del hipocampo completo, las cuales impiden el aprendizaje de la tarea (Crawley, 2000). En ratas también se produce una deficiencia en el desempeño de la tarea por lesiones en el área del *septum* medial/banda diagonal de Broca, en las cortezas entorinal/peririnal o con tratamientos farmacológicos usando antagonistas glutamatergicos o colinérgicos (Crawley, 2000).

Al entrenar a los roedores en la tarea de hallar la plataforma escondida (Ver materiales y métodos) no hay ningún señalamiento asociado directamente con la plataforma y su localización solo puede lograrse usando pistas visuales distantes (Tsien, et al, 1996; Ramírez-Amaya, et al, 1999; D'Hooge y De Deyn, 2001). Dadas estas condiciones se asume que el aprendizaje es el resultado de la elaboración de un mapa cognitivo (representando al contexto) que codifica las relaciones geométricas entre las señales y el espacio, independientemente de la posición del animal (Save y Poucet, 2005). Esta estrategia de navegación es flexible, pues permite que la rata ensaye nuevas trayectorias hacia un punto determinado sin que las haya utilizado previamente, sobre todo cuando la trayectoria usual está obstruida o una de las pistas espaciales está ausente (Save y Poucet, 2005).

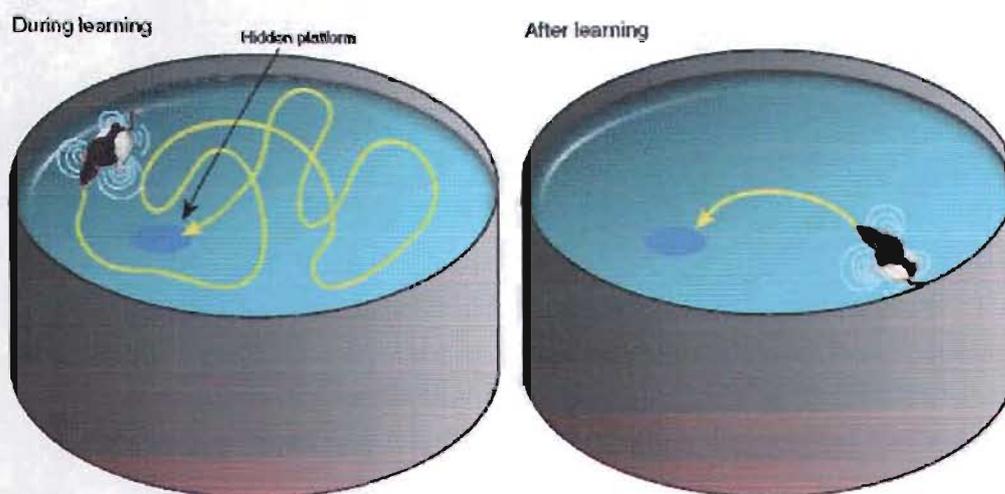


Figura 2. Aspecto del laberinto de Morris donde se ejemplifican las rutas seguidas por la rata antes (izquierda) y después (derecha) del entrenamiento (tomado de Squire, et al, 2003).

El aprendizaje en el laberinto de Morris es un comportamiento motivado por la evasión de una situación adversa; aún cuando los factores hostiles son minimizados tanto como es posible, la adquisición de la tarea es un evento estresante para los animales (D'Hooge y De Deyn, 2001).

C. EL ESTRÉS Y EL EJE HIPOTÁLAMO-PITUITARIA-ADRENAL

Los estímulos estresantes como la hipotermia o nado forzado provocan la activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) en los roedores. La respuesta del eje HPA se inicia en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) donde se promueve la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) a los capilares de la eminencia media; ésta alcanza a los corticotropos de la pituitaria anterior y causa la liberación de adrenocorticotropina (ACTH). ACTH estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides (GC) (corticosterona [CT] en rata) de la médula adrenal (Smythe, et al, 1997, figura 3).

Los GC son esteroides esenciales para la adaptación fisiológica al estrés, pero resultan dañinos si las concentraciones en plasma se encuentran elevadas por largos periodos de tiempo (Smythe, et al, 1997). El eje HPA está regulado por sistemas de retroalimentación negativa en el cerebro y la pituitaria, sensibles a los niveles circulantes de GC, que inhiben la secreción de CRH y ACTH, evitando la liberación sostenida de GC (Smythe, et al, 1997) (Figura 3).

Hay dos clases de receptores de GC en el cerebro y la pituitaria, ambos son proteínas citoplasmáticas cuya forma activa es la unida a GC que altera la transcripción de diversos genes. Los efectos genómicos están muy bien documentados, sin embargo, las acciones rápidas como la fase temprana de la retroalimentación negativa del eje HPA, parecen ocurrir a nivel de la membrana plasmática. El receptor a mineralocorticoides (MR) une con alta afinidad a la CT (Kd 0.5-1.0 nM) mientras que el receptor a glucocorticoides (GR) lo hace con menor afinidad (2.0-5.0 nM). En condiciones basales, en las que la concentración sanguínea de CT es de 2-8 µg/dl, los MR están totalmente ocupados, mientras que el 70% de los GR está disponible; por lo tanto los efectos de la liberación de CT, en un evento estresante, están regulados por los GR (Smythe, et al, 1997).

De todas las regiones cerebrales involucradas en la retroalimentación negativa del eje HPA, la mejor caracterizada es la formación hipocampal, donde se encuentra la mayor

densidad de MR y GR. Se ha demostrado que la estimulación de GR hipocampal participa en la inhibición de la liberación de ACTH y CT en la retroalimentación negativa del eje (Smythe, et al, 1997).

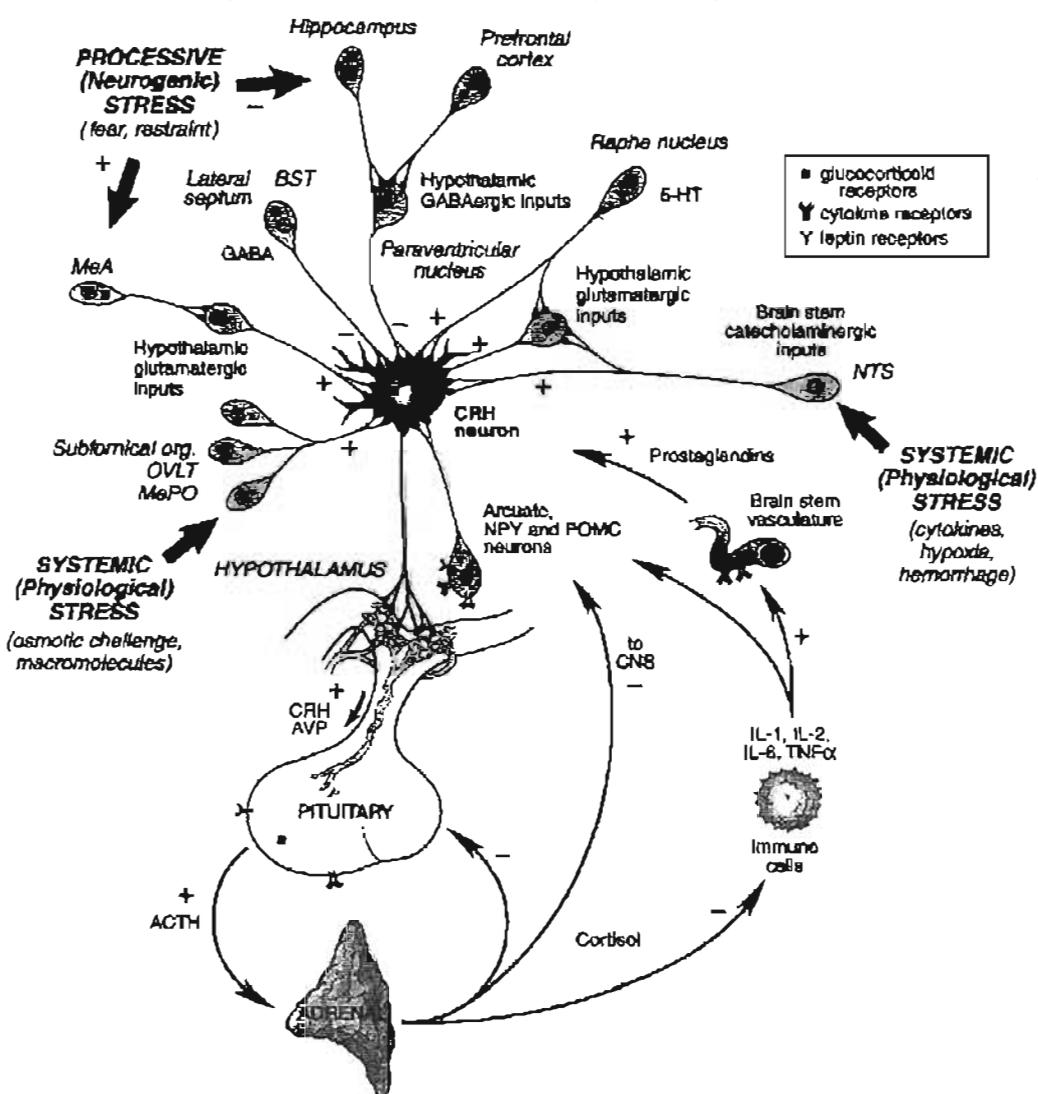


Figura 3. El eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal en la respuesta al estrés. La neurona CRHérgica del NPV integra la información neuronal del sistema nervioso central (de la amígdala, hipocampo, septum, etc.), y de tipo humoral (glucocorticoides, citocinas). En condiciones de estrés el CRH se libera a los capilares de la eminencia media de donde viaja hasta la pituitaria anterior y estimula la liberación de ACTH de los corticotropos. ACTH viaja por el torrente sanguíneo hasta su blanco en las células de la corteza adrenal, ahí incrementa la liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en rata). Los GC estimulan el metabolismo anabólico, permitiendo la generación de energía necesaria para que el animal manifieste conductas que le permitan contender con la situación estresante. Los GC son parte del sistema de retroalimentación negativa que inhibe la actividad del eje HPA por unión a su receptor de baja afinidad GR en la pituitaria anterior y en regiones del SNC como el hipocampo (tomado de Cone, et al, 2003).

Un estrés excesivo (con gran aumento de GC) impide la formación de la memoria espacial, en este contexto la activación del GR está asociada a pérdida neuronal en el hipocampo (Herman y Spencer, 1998; Karandrea, et al, 2002). Sin embargo, los glucocorticoides liberados después de una experiencia emocional facilitan el proceso de consolidación de información previamente aprendida, aunque, de nuevo, un excesivo aumento impide el recuerdo de información aprendida (D'Hooge y De Deyn, 2001; Roozendaal, 2003).

La curva dosis-respuesta sigue una relación en forma de "U" invertida, donde la ausencia o exceso de glucocorticoides resultan perjudiciales y las dosis moderadas favorecen la adquisición y el recuerdo de tareas aprendidas (D'Hooge y De Deyn, 2001; Roozendaal, 2003).

D. LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)

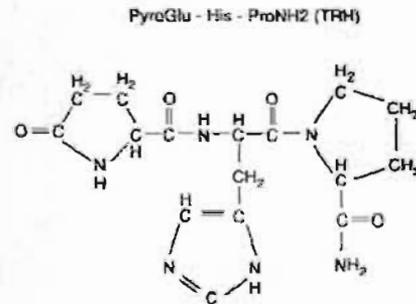
En los últimos años se ha centrado la atención en el papel potencial de los neuropéptidos en el aprendizaje y la memoria (de Wied, 1997; Bennett, et al, 1997), aunque la mayoría de las evidencias provienen de la manipulación farmacológica de animales en un contexto de aprendizaje. Varios neuropéptidos parecen facilitar o producir cambios que mejoran el desempeño cognitivo; entre ellos se encuentran la vasopresina, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la somatostatina, la sustancia P, el neuropéptido Y, el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) y el TRH (Bennett, et al, 1997).

El tripéptido piroglu-his-pro-NH₂ denominado TRH (Figura 4A) fue la primera hormona hipotalámica en ser aislada por su capacidad de estimular la secreción de tirotropina (TSH) de la pituitaria anterior (Schally, et al, 1969). Sus efectos neuroendócrinos han sido bien caracterizados (Joseph-Bravo, et al, 1998). Se han identificado dos tipos de receptores acoplados a proteínas G (TRH R1 y TRH R2) (Figura 5) (Gershengorn y Osman, 1996; Cao, et al, 1998) y una enzima de alta especificidad que lo degrada, la piroglutamil peptidasa II (PPII). La actividad de la PPII representa el principal mecanismo de inactivación extracelular del TRH (Charli, et al, 1998).

En la rata el TRH se sintetiza a partir de un RNA mensajero (RNAm) que codifica para una proteína de 255 aminoácidos, la cual contiene 5 secuencias progenitoras del

péptido (Glu - His - Pro - Gly, 6 en el humano) (Figura 4B) (Lechan, et al, 1986; Valentijn, et al, 1998).

A



B



Figura 4. A) Estructura del TRH. B) Estructura de la proteína precursora que en la rata contiene 5 secuencias progenitoras del TRH flanqueadas por un par de residuos básicos (Lisina-Arginina o Arginina-Arginina) (tomado de Squire, et al, 2003).

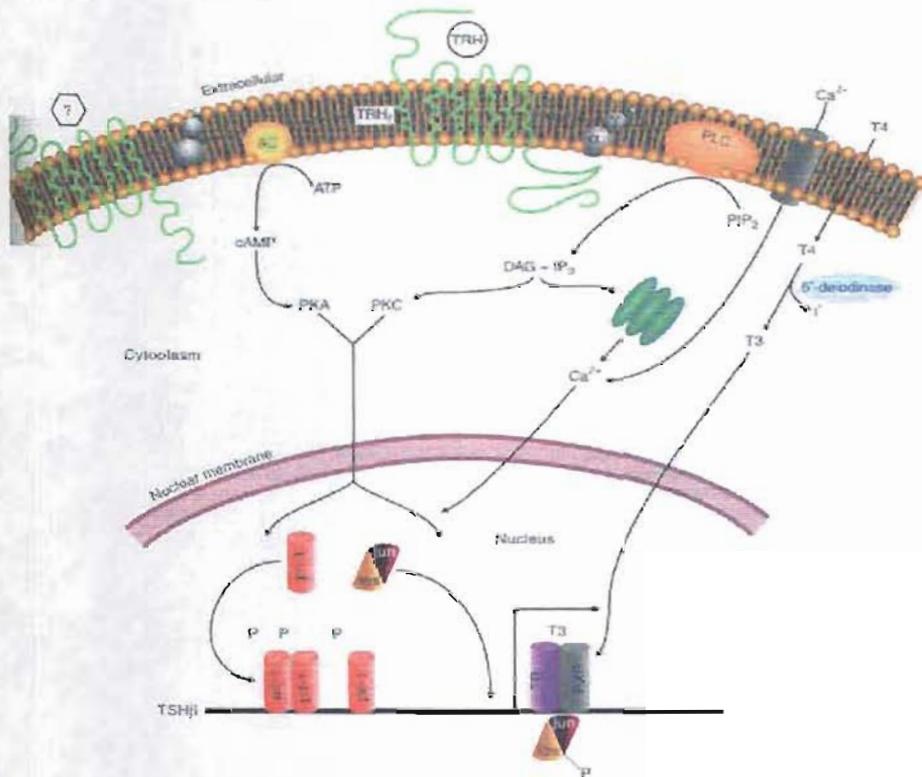


Figura 5. Vías de señalización intracelular activadas por el receptor de TRH (TRH R1) en los tirótopos de la adenohipófisis. AC, adenilato ciclasa; DAG, diacil glicerol; IP₃, inositol trifosfato; PIP₂ fosfoinositol bifosfato; PKA, fosfocinasa A; PKC, fosfocinasa C; PLC, foafolipasa C; RXR, receptor del retinoide X; T3, triyodotironina; T4, tetrayodotironina; TR, receptor de hormona tiroidea (tomado de Squire, et al, 2003).

El TRH se forma a partir del precursor por la acción sucesiva de convertasas de la prehormona, de las carboxipeptidasas E y D, de la monooxigenasa α – amidante de la peptidilglicina (PAM) y de la glutamil ciclasa (Bauer, et al, 1999).

El TRH, sus receptores y la PPII están presentes en varias regiones del SNC además del hipotálamo (Lechan, et al, 1986; Cao, et al, 1998; Heuer, et al, 2000). Por ejemplo, en la formación hipocampal se pueden observar células inmuno positivas a TRH en las capas piramidal y granular, en la zona ventral del giro dentado, en la corteza entorinal y alrededor de la fisura rinal (Hökfelt, et al, 1989).

En los ensayos de unión del ligando y autoradiografía se detectan a los receptores de TRH (sin que sea posible distinguir entre los 2 tipos) en la porción ventral del giro dentado, el subículo ventral, la corteza entorinal y la fisura rinal (Sharif y Burt, 1985; Manaker, et al, 1985; Mantyh y Hunt, 1985).

La hibridación *in situ* (Figura 6, columna B) permite visualizar el RNAm del TRH R1 en las cortezas peririnal, entorinal, el subículo y en la capa granular del giro dentado ventral (Heuer, et al, 2000). El del proTRH también se encuentra en el giro dentado, sobre todo en la porción anterior (Figura 6, columna C) (Heuer, et al, 2000). El del TRH R2 (Figura 6, columna A) está enriquecido en el tálamo, y dentro de la formación hipocampal se encuentra solamente en el subículo y el hipocampo precomisural (taenia tecta); el de la PPII (Figura 6, columna D) es muy abundante en las neuronas piramidales de CA1, CA2, CA3 y en la corteza entorinal (Heuer, et al, 2000). También, la actividad de la PPII está presente en la corteza cerebral y el hipocampo (Vargas, et al, 1987).

En la tabla 1 se resume la distribución de los elementos de transmisión TRHérgica en la formación hipocampal de la rata.

TABLA 1
DISTRIBUCIÓN DE LOS ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN DEL TRH EN LA FORMACIÓN HIPOCAMPAL

	CA1	CA2	CA3	Giro Dentado	Subículo	Corteza entorinal
TRH	++	++	++	++ (ventral)	++	++
RNA _m proTRH	-▲	-	-▲	+++ (dorsal)	++	-
Unión	++	++	++	++++ (ventral)	++++	++++
RNA _m del TRH R1	+	+	+	+++ (ventral)	-	+++
RNA _m del TRH R2	-▲	-▲	-	-	++++	-
RNA _m de la PPII	++++	++++	++++	+	++++	+++

Cada uno de los parámetros fue medido en la formación hipocampal de ratas adultas intactas. -: ausente; +: muy bajo; ++: bajo; +++: medio; ++++: alto; +++++: muy alto; +*: presente, la cantidad relativa no fue estimada; ▲ aparece expresión en condiciones de estimulación (por ejemplo "kindling" amigdalino). Tomado de: Sharif y Burt, 1985; Manaker, et al, 1985; Mantyh y Hunt, 1985; Heuer, et al, 2000; de Gortari, et al, sometido.

El proceso de liberación del TRH ocurre por excitación regulada en respuesta a un estímulo. El TRH que participa en el control neuroendócrino de la tiroides se sintetiza en el NPV y se libera de la eminencia media al sistema porta que irriga la hipófisis y controla la síntesis y liberación de TSH (Lechan y Toni, 1992; Joseph-Bravo, et al, 1998). Los sistemas endócrino, nervioso e inmune regulan su biosíntesis; en el promotor del gen del proTRH están presentes: el elemento de respuesta al factor de crecimiento epidérmico, el elemento de unión del receptor de glucocorticoides (GRE), dos elementos imperfectos de respuesta a AMP cíclico (CRE) y otro para el receptor de hormonas tiroideas (TRE) (Lee, et al, 1988).

Se ha demostrado que en el NPV la regulación del TRH, que es rápida y transitoria, ocurre en respuesta a estímulos como la exposición al frío (liberando TSH) o, en la madre lactante, la succión por las crías (liberando prolactina) (Uribe, et al, 1993); dicha regulación es debida a estimulación neuronal (Uribe, et al, 1995).

Los dos receptores del TRH son regulados homóloga (Hinkle y Tashjian, 1975; Oron, et al, 1987) y heterológamente. La inactivación homóloga (por pulsos agudos de TRH) produce la rápida y extensiva internalización del complejo ligando – receptor a través de vesículas cubiertas de clatrina (Ashworth, et al, 1995); el TRH R2 es internalizado e inactivado más rápidamente que el TRH R1 (O’Dowd, et al, 2000). Una segunda fase de exposición al TRH produce una disminución en la tasa de transcripción del gen del TRH R1 y un decremento en la estabilidad de su RNAm (Gershengorn y Osman, 1996; Yu y Hinkle, 1997); aunque se ha reportado incremento en la síntesis del RNAm del TRH R1 por estimulación con TRH en células de la línea HEK-293 (Cook y Hinkle, 2004).

En modelos animales de epilepsia, por estimulación eléctrica subumbral (“*kindling*”) (Kubek, et al, 1993; de Gortari, et al, 1995; Knoblach y Kubek, 1997) o administración de kainato (Jaworska-Feil, et al, 1999), el TRH y su RNAm se incrementan en el hipocampo, la amígdala y la corteza frontal, mientras que la unión de TRH (receptores) disminuye en las mismas regiones (de igual forma que los RNAm del TRH R2 y el TRH R1; de Gortari, et al, sometido). Los niveles de TRH incrementan proporcionalmente a la frecuencia de descarga conforme el “*kindling*” progresa y en relación a la susceptibilidad epileptogénica de cada región (de Gortari, et al, 1998). La PPII también está regulada en el SNC cuando se activan las neuronas TRHérgicas por “*kindling*” (de Gortari, et al, 1995; sometido) o con la inyección aguda de etanol (de Gortari, et al, 2000; 2005), sugiriendo que la regulación de los mecanismos de in-activación del péptido juega un papel en la neuromodulación o neurotransmisión TRHérgica.

Los datos anteriores permiten proponer que cuando las neuronas TRHérgicas son activadas hay cambios en la expresión del RNAm del proTRH y en los niveles de péptido procesado (Uribe, et al, 1995; Pérez Martínez, et al, 1998; Joseph-Bravo, et al, 1998), además en la expresión de receptores y/o la PPII en la post-sinapsis (Charli, et al, 1998).

El TRH tiene un papel neuromodulador en el sistema nervioso central, tal como lo sugieren experimentos farmacológicos *in vivo* e *in vitro* (Horita, 1998).

In vivo la administración de TRH o de sus análogos sintéticos induce, entre otros efectos, incremento en la vigilancia (Thompson y Rosen, 2000) y reducción en la narcosis inducida por etanol o barbitúricos (Morzorati, et al, 1993; French, et al, 1993).

El descubrimiento de que algunos de los efectos analépticos ocurren por la activación de los sistemas colinérgicos septo-hipocampal y basalis-cortical (involucrados

en alerta y memoria) (Toide, et al, 1993), llevó a investigar los posibles efectos cognitivos de la hormona (Horita, 1998). La administración oral o nasal del TRH o sus análogos previene el deterioro de la memoria provocado por lesiones en el cerebro frontal basal o en el núcleo basal magnocelular (Yamamura, et al, 1991; Miyamoto, et al, 1993; Panocka, et al, 1997). Por ejemplo, el análogo de TRH llamado NS-3, mejora la consolidación y recuerdo de la tarea de evasión pasiva y el desempeño en los laberintos radial de 8 brazos y en T en roedores con amnesia inducida por escopolamina, lesiones del núcleo basal magnocelular, hipoxia o cicloheximida (Ogasawara, et al, 1995a; 1995b; 1996). Otro análogo del TRH mejora parcialmente el desempeño de ratas con lesiones septo-hipocampales en una tarea que requiere de memoria de trabajo (Ballard, et al, 1996).

El TRH mejora el desempeño en la tarea espacial del laberinto de Morris de ratones con senescencia acelerada y de humanos o roedores sometidos a terapia electroconvulsiva (Miyamoto, et al, 1994; Khan, et al, 1994; Ogasawara, et al; 1995b; Zervas, et al, 1998).

Si bien muchos de estos efectos podrían deberse a un incremento en la liberación de acetilcolina en la corteza frontal y/o el hipocampo, también se ha visto que antagonistas de los receptores tipo NMDA bloquean la capacidad del TRH para facilitar la retención y el recuerdo de la tarea de evasión pasiva (Kasparov y Chizh, 1992).

In vitro, el TRH (que por sí mismo no cambia el potencial de membrana) altera la transmisión glutamatérgica en el hipocampo al incrementar las respuestas despolarizantes del NMDA en la sinapsis entre la vía perforante y el giro dentado y en neuronas piramidales de CA1, donde también incrementa la hidrólisis de fosfolípidos de inositol (Stocca y Nistri, 1995; Morimoto, et al, 1986). En las sinapsis del giro dentado en CA3 facilita la LTP (Ishihara, et al, 1992). Paradójicamente, aunque no se ha encontrado efecto directo sobre los niveles de calcio, puede inhibir el incremento intracelular de la concentración del ion cuando se estimula con NMDA o AMPA (Koenig, et al, 1996). De hecho, algunos análogos del TRH con modificaciones en el extremo N-terminal (Cao, et al, 1998) muestran actividad neuroprotectora en neuronas corticales e hipocampales tratadas con glutamato (Renaud, et al, 1979; Koenig, et al, 1996; Pizzi, et al, 1999).

El TRH también modula la transmisión GABAérgica produciendo una depresión reversible de los potenciales inhibitorios postsinápticos rápidos mediados por GABA_A en CA1 (Stocca y Nistri, 1996; Barbieri y Nistri, 1997; Crews, et al, 1996).

Se ha postulado que el efecto del TRH sobre la actividad de los receptores NMDA y GABA_A, ocurre por fosforilación a través de la PKC, ya que: a) los receptores NMDA y GABA_A presentan sitios potenciales de fosforilación por la PKC (Stocca y Nistri, 1996) y, b) los efectos neuroprotectores del TRH se revierten al inhibir la PKC (Pizzi, et al, 1999; Shishido, et al, 1999).

IV. HIPÓTESIS

Si el TRH participa en el aprendizaje espacial, las neuronas TRHérgicas serán activadas en zonas involucradas, como el hipocampo. En vista de que la activación de las neuronas TRHérgicas puede producir un incremento del RNAm del proTRH y en la post-sinapsis un cambio en el nivel de expresión de sus receptores y de la enzima inactivadora (PPII), postulamos que los cambios en alguna de estas variables permiten inferir la participación de las neuronas en un modelo conductual como el laberinto de Morris.

V. OBJETIVOS

Estudiar la posible participación del TRH en los procesos de aprendizaje y formación de la memoria.

Objetivos particulares:

- 1) Cuantificar los RNA mensajeros del proTRH, sus receptores y la PPII en el hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto de Morris.
- 2) Cuantificar el RNAm del GR y los niveles circulantes de corticosterona como medidas de estrés.
- 3) Caracterizar, por hibridación *in situ*, los cambios en el RNA mensajero del TRH R1.

Se ha postulado que el efecto del TRH sobre la actividad de los receptores NMDA y GABA_A, ocurre por fosforilación a través de la PKC, ya que: a) los receptores NMDA y GABA_A presentan sitios potenciales de fosforilación por la PKC (Stocca y Nistri, 1996) y, b) los efectos neuroprotectores del TRH se revierten al inhibir la PKC (Pizzi, et al, 1999; Shishido, et al, 1999).

IV. HIPÓTESIS

Si el TRH participa en el aprendizaje espacial, las neuronas TRHérgicas serán activadas en zonas involucradas, como el hipocampo. En vista de que la activación de las neuronas TRHérgicas puede producir un incremento del RNAm del proTRH y en la post-sinapsis un cambio en el nivel de expresión de sus receptores y de la enzima inactivadora (PPII), postulamos que los cambios en alguna de estas variables permiten inferir la participación de las neuronas en un modelo conductual como el laberinto de Morris.

V. OBJETIVOS

Estudiar la posible participación del TRH en los procesos de aprendizaje y formación de la memoria.

Objetivos particulares:

- 1) Cuantificar los RNA mensajeros del proTRH, sus receptores y la PPII en el hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto de Morris.
- 2) Cuantificar el RNAm del GR y los niveles circulantes de corticosterona como medidas de estrés.
- 3) Caracterizar, por hibridación *in situ*, los cambios en el RNA mensajero del TRH R1.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar (250 a 300 gramos de peso) crecidas en el vivario del Instituto de Fisiología Celular (UNAM) y transferidas, 3 semanas antes del experimento, a cajas individuales de acrílico en un cuarto cercano al laboratorio de experimentación con el ciclo luz/oscuridad invertido (12/12, luz de 7 p.m. a 7 a.m.). Agua y alimento fueron administrados *ad libitum* (se realizaron 2 experimentos para RT-PCR, n=92 y n=42, y uno para ISH, n=9).

A. ENTRENAMIENTO

La tarea conductual fue desempeñada en un laberinto de agua que consiste en una alberca circular de plástico negro, de 150 cm de diámetro y 100 de altura, con agua a 21 ó 22°C hasta 25 cm de altura (suficiente para impedir que el animal se balancee sobre la cola apoyada en el fondo del tanque o se escape por las orillas). Contiene una plataforma de escape hecha de Plexiglas transparente, de 12 cm de diámetro y sumergida 1 cm en el agua.

La alberca está dividida en 4 cuadrantes imaginarios y está rodeada de varios objetos que funcionan como pistas espaciales (carteles en la pared, equipo de monitoreo en las mesas). Está localizada en un cuarto independiente, iluminado por luz tenue y cercano al cuarto donde se mantienen los animales (a 15 m aproximadamente).

Los animales fueron entrenados (de 9 a 12 a.m.) por 1, 3 ó 5 días para encontrar la plataforma. El entrenamiento consistió en introducir la rata en la alberca (por puntos distintos cada vez); el animal nadó por 60 segundos (o hasta que encontraba la plataforma); si no la encontraba en ese tiempo era colocado en ella; se le permitió estar en la plataforma por 10 segundos. Esto se repitió 10 veces por día. El grupo *control de nado* correspondió a un número equivalente de animales que fueron introducidos a la alberca sin la plataforma, del mismo modo que los entrenados, y nadaron el tiempo promedio medido en los animales entrenados (D'Hooge y De Deyn, 2001). En el experimento en el que los cerebros se usaron para hibridación *in situ*, se incluyó un grupo *control habituado*, el cual no estuvo en contacto con el laberinto, pero fue manipulado de la misma forma que los otros dos grupos, es decir, transportado del cuarto en que los animales son mantenidos al cuarto de entrenamiento en todas las sesiones.

Se incluyó un grupo intacto (que fue sacrificado inmediatamente después de salir por primera vez del cuarto) y un grupo de ratas entrenadas por 4 días y sacrificadas 24 horas después (al 5to día sin que se sometieran al entrenamiento en ese último día).

B. SACRIFICIO DE LAS RATAS Y DISECCIÓN DEL TEJIDO

Los animales fueron sacrificados con guillotina (en un cuarto adyacente al de la alberca), a los 5, 30 ó 60 minutos después del último entrenamiento (al primer, tercer o quinto día). La sangre del tronco se colectó en tubos y se separó el suero que se mantuvo en alícuotas a -20° C.

Los cerebros fueron escindidos cuidando de cortar el nervio óptico para no desgarrar la eminencia media y se congelaron a -70° C. Para la extracción del RNA y la cuantificación de TRH por RIA, el hipocampo fue disecado manualmente de rebanadas comprendidas en las siguientes coordenadas (Palkovits y Brownstein, 1988): 2400 μ m-3600 μ m para el hipocampo anterior y 4500 μ m-6000 μ m para el hipocampo posterior. En cada rebanada se hizo un corte longitudinal para separar al hemisferio izquierdo del derecho y cada región fue almacenada individualmente a -70° C. La región izquierda se usó para extracción de RNA y la derecha para RIA.

C. RADIOINMUNOENSAYOS

Los niveles circulantes de corticosterona se midieron como se describe en De Gortari, et al (1995). Se realizó una dilución 1:1000 de todas las muestras de sueros en amortiguador diluyente para esteroides (50 mM de fosfatos [pH 7.5] y 150mM de NaCl); se tomaron 500 μ l de cada dilución. El anticuerpo (Ab) contra corticosterona [ICN Farmacéutica] fue utilizado a una dilución de 1:1200 en el mismo amortiguador. La corticosterona tritiada [Amersham] contenía 100 cpm/ μ l

Se realizó la siguiente mezcla de incubación: 100 μ l de anticuerpo contra corticosterona, 500 μ l de solución de corticosterona de la curva estándar o sueros problema y 100 μ l de la corticosterona tritiada. Para la preparación de la curva estándar se hicieron diluciones de corticosterona [ICN Farmacéutica] de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg en 500 μ l del amortiguador para esteroides. Además se tenían tubos denominados

B₀ que contenían mezcla de incubación sin corticosterona y tubos para determinar el pegado no específico que contenían 600 µl de amortiguador diluyente de esteroides.

Todos los tubos se mantuvieron en agitación a 98° C durante 10 minutos, se enfriaron a temperatura ambiente e incubaron a 4° C durante 24 horas. El antígeno no unido al anticuerpo se separó al añadir 200 µl de una solución carbón-dextrán a 4° C y centrifugar a 980 x g durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a tubos con 4 ml de líquido de centelleo [Ecolite, ICN] para el conteo de radiación β (cpm) en un contador automatizado [Beckman].

El anticuerpo anti-TRH y las condiciones del radioinmunoensayo de TRH han sido previamente optimizadas (Joseph-Bravo, et al, 1979; Méndez, et al, 1987). El TRH fue iodinado por el método de cloramina T utilizando ¹²⁵I [Perkin Elmer]. Los tejidos fueron homogenizados en 500 µl de ácido acético al 20% y centrifugados a 4° C durante 10 minutos a 12000 x g. Al sobrenadante se le añadió metanol (concentración final 90%), se dejó precipitando por 12 horas a -20° C y se centrifugó a 11,000 x g. El sobrenadante fue evaporado y resuspendido en una solución de albúmina sérica bovina al 0.25%, NaCl 0.15 M y amortiguador de fosfatos 0.05 M (pH 7.4); el antígeno frío, iodinado o el anticuerpo se diluyeron en la misma solución.

Se prepararon mezclas de incubación con 100 µl de anticuerpo anti-TRH (Joseph-Bravo, et al, 1979), 100 µl de solución de TRH frío para la curva estándar o de las muestras problema y 100 µl de solución con 5000 cpm de I¹²⁵ TRH. Para la preparación de la curva estándar se hicieron diluciones de TRH [Sigma] a 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg. También se incluyeron tubos B₀.

Los tubos se incubaron a 4° C por 48 horas. Se les añadió 1 ml de etanol (4°C) (Merck), se agitaron y centrifugaron a 4° C por 30 minutos a 980 x g para precipitar los complejos antígeno-anticuerpo. El sobrenadante fue desechado y cuantificó la radiación γ (cpm) en un contador automático (LKB Wallace Miligamma Counter).

Se usó la transformación logit (Odel y Daughaday, 1971) de los valores de cuentas por minuto para el cálculo de la concentración.

D. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL

Para extraer el RNA total de los tejidos se empleó el protocolo de Chomczynski y Sacchi, 1987. Todas las soluciones fueron preparadas con agua desionizada, tratada con DEPC y esterilizada. El tejido fue homogenizado en 400 μ l de solución D (4 M tiocianato de guanidina, 0.5% de sarcosil, 1M β -mercaptoetanol, 0.026 M citrato de sodio pH 7.2). Al homogenizado se le añadieron 40 μ l de acetato de sodio 2 M (pH 4.0) y se agitó vigorosamente.

La mezcla se mantuvo a 4° C, se le agregaron 400 μ l de fenol saturado con agua y se agitó de la misma forma. A lo anterior le fueron agregados 80 μ l de una solución cloroformo-alcohol isoamílico (49:1) y se agitó durante 1 minuto. Después, se dejó reposar en hielo (4° C) por 15 minutos y se centrifugó (también a 4° C) por 17 minutos a 14500 x g. El sobrenadante se mezcló con 450 μ l de isopropanol, se agitó y dejó reposar por 60 minutos, se centrifugó a 4° C a 14500 g por 22 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 300 μ l de solución D; a esta suspensión se agregaron 300 μ l de isopropanol y se dejó a -20° C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó (4° C) a 14500 x g por 22 minutos; al sedimento resultante se le añadieron 400 μ l de etanol frío al 70%, se agitó y se centrifugó en las mismas condiciones por 15 minutos. Finalmente, el sobrenadante fue desechado, el sedimento secado a temperatura ambiente (5 a 10 minutos) y el RNA resuspendido en 50 μ l de agua desionizada (tratada con DEPC y recién esterilizada).

E. CUANTIFICACIÓN DEL RNA TOTAL

1 μ l del RNA resuspendido fue diluido en 99 μ l de agua esterilizada. Esta solución se colocó en una celda de cuarzo de 1 ml para medir la densidad óptica con luz ultravioleta de 230, 260 y 280 nm. Se consideró una preparación de RNA adecuada cuando la lectura a 260nm era 2 veces la de 230 ó 280nm; si no era el caso, se repitió la resuspensión y precipitación con alcohol. La concentración del RNA se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{(\text{densidad óptica}) (\text{factor de dilución}) (40)}{1000}$$

Se verificó la calidad del RNA por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a 28 y 18S debían guardar una proporción de 2:1 y no haber mostrado barridos que indicasen degradación.

F. RT-PCR

Del RNA total se tomó 1 µg para la transcripción reversa. El RNA se llevó a un volumen final de 12 µl con agua DEPC y, por separado, se preparó la mezcla de reacción: 8.9 µl de agua DEPC, 6 µl de buffer de transcripción 5X, 3 µl de DTT (0.1M), 0.6 µl de solución de desoxirribonucleótidos (10 mM), 1 µl de solución de oligodeóxinucleótido de timinas (0.5 µM) y 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa (200 U/µl). Antes de agregar la mezcla de reacción, el RNA fue mantenido 10 minutos a 70° C, luego fue colocado en hielo por 5 minutos y se le añadió la mezcla de reacción (20 µl). Se incubó a 37° por 2 horas.

Todas las reacciones de PCR (50 µL) se llevaron a cabo en la siguiente mezcla: agua DEPC (volumen en función de la cantidad de DNAc), 5 µl de buffer 10X, 2.5 µl MgCl₂ 30 mM, 1 µl de deoxinucleótidos fosfato 10 mM, 1 µl de cada uno de los oligonucleótidos cebadores sentido y antisentido (25 pmol para proTRH, R1, R2, PPII y GR; 50 pmol para ciclofilina) y 0.5 µl de Taq polimerasa de DNA 5 U/µl. Los oligonucleótidos fueron diseñados usando el programa Oligo v.4.0, para verificar la ausencia de estructuras secundarias y de la formación dímeros entre los oligonucleótidos; la especificidad fue verificada mediante el algoritmo BLAST (herramienta básica de búsqueda de alineamientos locales, Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI.

Ciclofilina (DNAc 166-422 [Danielson, et al., 1988]) producto final: 256 pb; sentido 5'GGGGAGAAAGGATTTGGATA3', anti-sentido 5'ACATGATTGCCATCCAGCA3' (Muller, et al, 1998). ProTRH (DNAc 109-807 [Lechan, et al., 1986]) producto final 700 pb; sentido 5'GGACCTTGGTTGCTGTCGACTCTGGCTTTG3', anti-sentido: 5'ATGACTCCTGCTCAGGTCATCTAGAAGCT3'. TRH-R1 (DNAc 169-518 [Zhao, et al., 1992]) producto final: 350 pb; sentido 5'ACCCAGAGAAGCAGGCAGAGTGACA3', anti-sentido 5'GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG3'. TRH R2 (DNAc 437-959 [Cao, et al., 1998]) producto final: 523 pb; sentido 5'GTCTTCCTAGTGCTCCTGGTGTG3', anti-sentido 5'CCAGCAAGGGTCCGATGAAAAAG3'. PPII (DNAc 1644-2061 [Schauder, et al, 1994]) producto final: 418 pb; sentido 5'CTGGATCGCATACAAA3', anti-sentido 5'GGACACCCAAATAATTGCT3'. GR (DNAc 4903-5566 [Miesfeld, et al, 1986])

producto final: 664 pb; sentido 5'AAAAGCACATCACACATAAATCTG3', anti-sentido 5'TAAATAAGAGGGAGCAAACACTACTGG3'.

Las PCRs fueron realizadas en el Mastercycler de Ependorff. Las condiciones de PCR fueron 94°C por 30 segundos, 64°C por 1 minuto (excepto PPII, 55°C, y TRH R2, 67°C) y 72°C por 1 minuto, el número de ciclos es específico para cada DNAc (ver resultados); se dio una extensión final de 10 minutos a 72°C.

De los productos de PCR se tomaron 10 µl que se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (3%) por aproximadamente 40 minutos a 100 volts. El gel fue teñido con bromuro de etidio. La cuantificación se realizó en un analizador de imágenes (Fluor-S Multilmager). La migración de los productos de PCR fue comparada con la de marcadores de peso molecular en el rango de 2176-154 nt.

G. HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Al momento de procesar los cerebros fueron mantenidos a -20°C en un criostato (Bright Instruments Inc.) en el que se hacen cortes coronales de 20µm de grosor. El hipocampo anterior se comenzó a colectar a la altura del Bregma -2.3mm, tomando cada 6 rebanadas hasta -4.16 mm. El hipocampo posterior se colectó desde -4.8mm hasta -6.4mm. Los cortes fueron montados en portaobjetos cargados electrostáticamente y guardados nuevamente a -70° C hasta su uso. Previo a la hibridación *in situ* los portaobjetos con los cortes de cerebro adheridos fueron descongelados en una corriente de aire caliente y sometidos al siguiente tratamiento de fijación a temperatura ambiente: 10 minutos en paraformaldehído al 4% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1X; dos lavados de 5 minutos en PBS1X; 10 minutos en solución SSC 4X (NaCl 300 mM y citrato de sodio 30 mM), 0.1 M de trietanolamina y 0.25% de ácido acético anhibro (pH 8.0); 2 minutos en SSC 2X; se deshidrataron 2 minutos en cada una de las siguientes soluciones de etanol: 75, 80, 95 y 100%; 5 minutos en cloroformo; se lavaron 2 minutos en cada una de las siguientes soluciones de etanol: 100 y 95%. Las laminillas fueron secadas a temperatura ambiente.

Para la hibridación *in situ* el cRNA de TRH R1 se sintetizó a partir del DNAc clonado en el plásmido p2HA-TRHR (donado por la Dra. P. Hinkle [Cook, et al, 2003]), y linearizado con HindIII (Boehringer). El RNA anti-sentido fue transcrito con la RNA

polimerasa de SP6 (Boehringer) usando α [^{35}S] UTP (1250 Ci/mmol, New England Nuclear); actividad específica 2×10^7 cpm/ μg .

Se realizó la hibridación por 10 horas a 52°C , cubriendo los tejidos con parafilm, y usando la sonda en un amortiguador de hibridación (SSC 4X, formamida al 50%, dextrán sulfato al 10%, fosfato de sodio 100 mM pH7.4, sarcosil al 1%, solución Denhart 1X [Albúmina sérica bovina al 0.02%, Ficol y polivinilpirrolidona], 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de esperma de salmón desnaturalizado 5 minutos a 65°C , RNA de transferencia de levadura 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, DTT 100 mM y poliA 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Posteriormente se hicieron los siguientes lavados: SSC 1X a 52°C para quitar la cubierta de parafilm; 2 lavados con SSC 2X y 50% de formamida a 52°C uno por 10 y otro por 20 minutos; 2 lavados de 5 minutos con SSC 2X a temperatura ambiente; un tratamiento con RNAsa A (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en SSC 2X, EDTA 1mM [pH8.0] por 30 minutos a 37°C ; dos lavados en SSC 2X de 5 minutos a temperatura ambiente; un lavado en SSC 2X y 50% de formamida por 15 minutos a 52°C ; dos lavados en SSC 0.1X y SDS al 0.02% de 15 minutos cada uno a 55°C ; deshidratación en etanol al 70 y al 80%.

H. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO

Los tejidos fueron secados a temperatura ambiente y expuestos, junto con micro-escalas de ^{14}C , a un film Biomax por días. La señal autoradiográfica de áreas circunscritas fue digitalizada y convertida a nCi/mg de tejido equivalente usando el programa RAG (Biocom, Leculis) y un sistema de imágenes (Biocom).

Donde se indica, una región del cerebro fue cuantificada en cortes de tejido cubiertos con emulsión autoradiográfica LM-1 (RPN 40, Amersham), secados al aire y expuestos (4°C) por 1 mes. Los granos de plata fueron revelados (revelador D19, Kodak), fijados (fijador GBX, Kodak) y contra-teñidos con hematoxilina. La señal autoradiográfica fue cuantificada usando una cámara de video (4815, COHU) montada en un microscopio (Axioscop, Zeiss) y una estación de imágenes Biacom. Las regiones fueron delineadas en campo claro y observadas en campo oscuro, se cuantificó la densidad óptica de cada región y se corrigió por la señal de fondo determinada al medir una región del mismo tamaño, que no exprese el RNAm en estudio.

I. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de los grupos de ratas entrenadas y los controles de nado se compararon mediante una prueba de t de dos colas considerando varianzas diferentes. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo. En los casos en los que se podía comparar los datos a lo largo de todo el experimento se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba Post-Hoc de Fisher ($p < 0.05$ fue considerada significativa).

VII. RESULTADOS

A. OPTIMIZACIONES METODOLÓGICAS

1. RT-PCR SEMI-CUANTITATIVA

Las condiciones óptimas para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de un RNA mensajero mediante RT-PCR son, entre otras, que los oligonucleótidos tengan una secuencia que sólo corresponda a la del DNAc para el cual fueron elegidos y que se conozca la cinética de PCR, tanto la del DNAc de interés como la del que será empleado como control endógeno. Es crítico que el ciclo en el que se analiza el producto de la reacción se encuentre en la fase logarítmica de la cinética, de forma que las mediciones reflejen lo más fielmente posible la cantidad del RNAm.

En todos los casos evaluados (TRH, sus dos receptores, PPII, GR y la ciclofilina) la comparación de las secuencias contra el banco de genes mediante el BLAST mostró que cada par de oligonucleótidos cebadores reconoce, en conjunto, solamente a la secuencia blanco (no mostrado).

El paso siguiente fue la determinación de las cinéticas de reacción con cada par de oligonucleótidos; se emplearon los volúmenes de DNAc indicados en la tabla 2.

<i>DNAc</i>	<i>HIPOCAMPO ANTERIOR</i>	<i>HIPOCAMPO POSTERIOR</i>
<i>TRH R1</i>	6ul	6ul
<i>proTRH</i>	6ul	6ul
<i>GR</i>	4ul	6ul
<i>TRH R2</i>	8ul	8ul
<i>PPII</i>	6ul	8ul
<i>Ciclofilina</i>	4ul	4ul

Las siguientes cinéticas fueron realizadas utilizando 25 pmol de oligonucleótidos para el caso de TRH, TRH R1, TRH R2, PPII y GR, y 50 pmol para la ciclofilina. En la figura 7 se muestran los resultados para la región anterior del hipocampo y en la 8 los de la posterior.

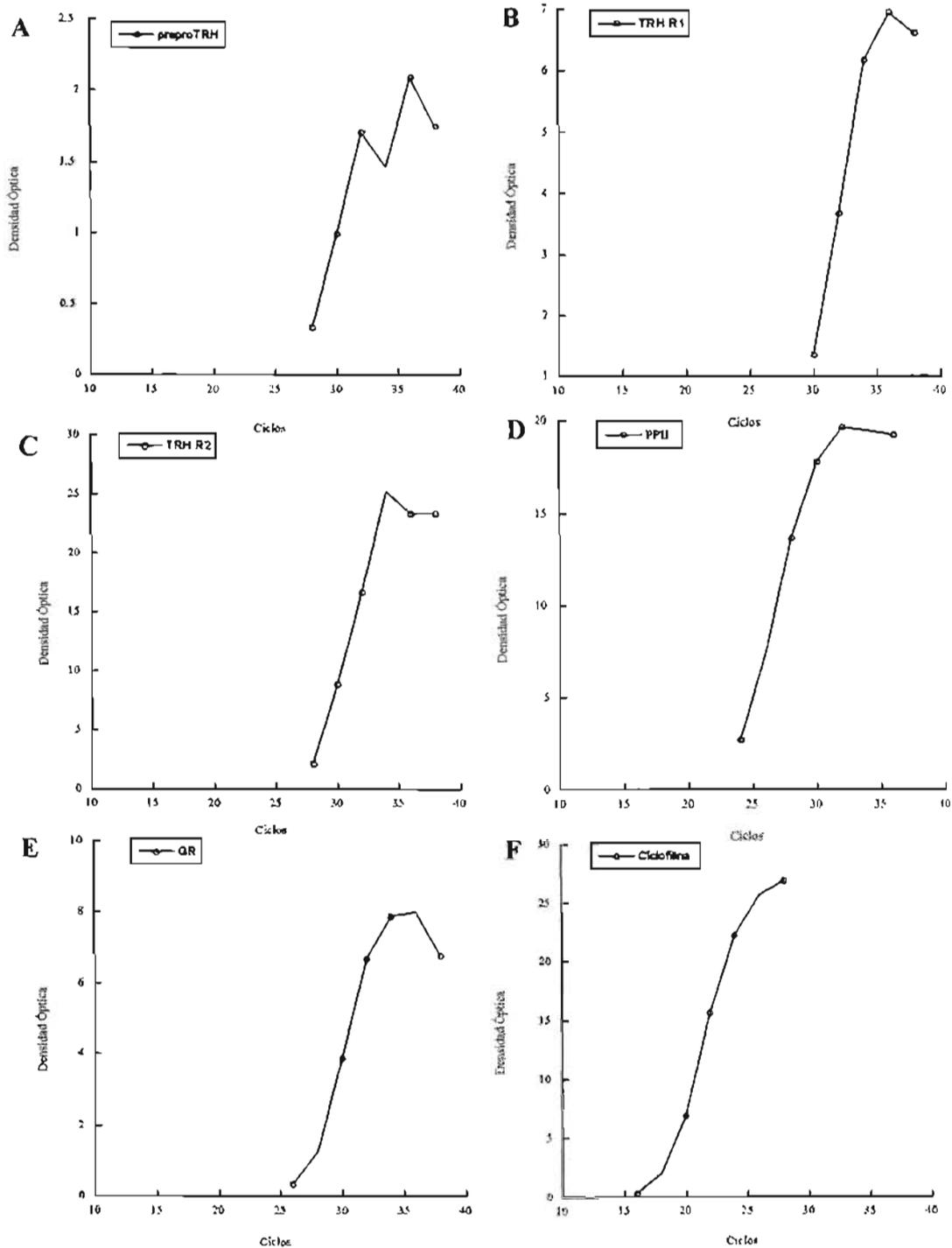


Figura 7. Cinética de la PCR para A) proTRH, B) TRH R1, C) TRH R2, D) PPII, E) GR y F) Ciclofilina en el hipocampo anterior. Las reacciones fueron llevadas a cabo usando 25 pmol (A-E) ó 50 pmol (F) de oligonucleótidos.

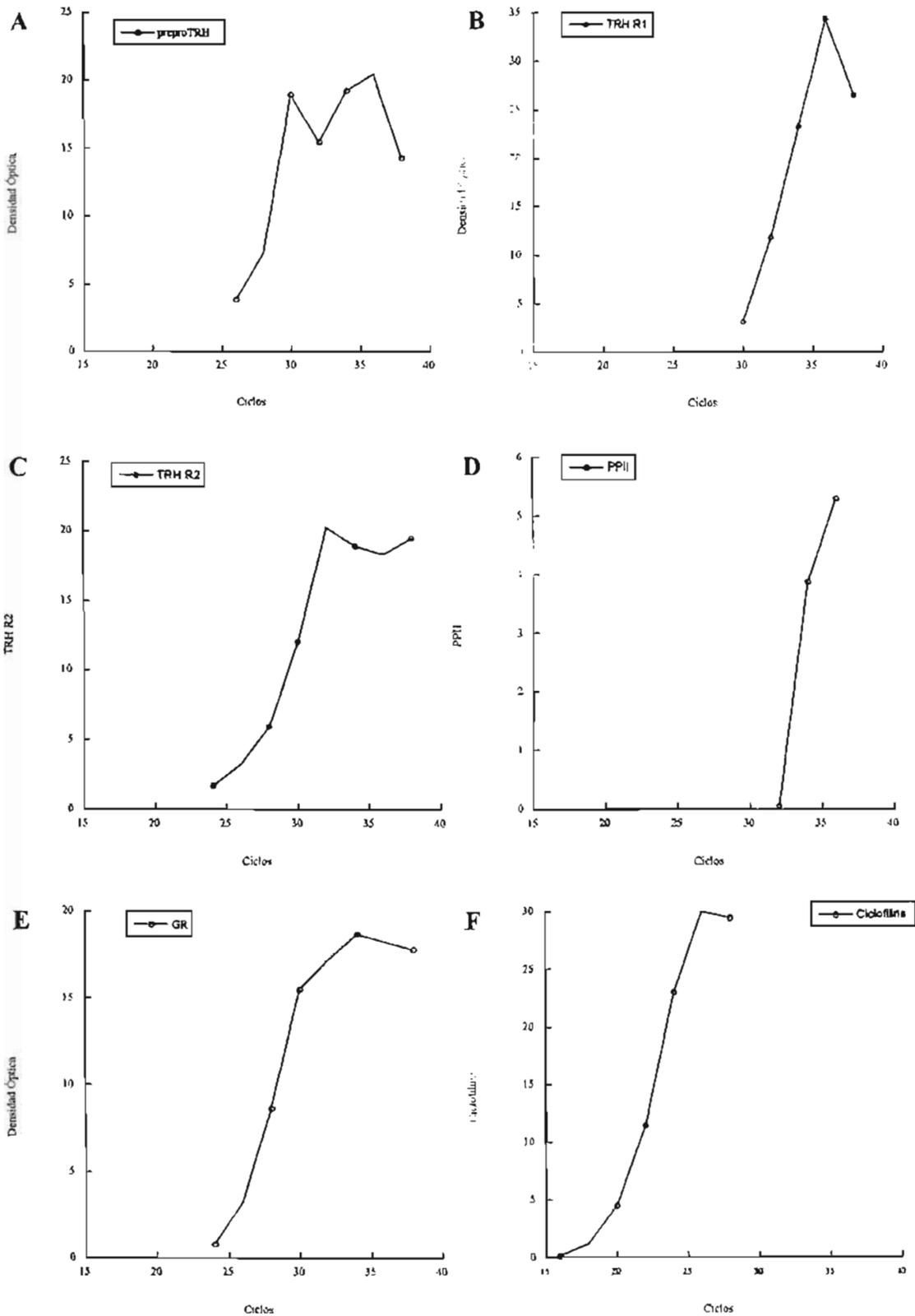


Figura 8. Cinética de la PCR para A) proTRH, B) TRH R1, C) TRH R2, D) PPII, E) GR y F) Ciclofilina en el hipocampo posterior. Las reacciones fueron llevadas a cabo usando 25 pmol (A-E) ó 50 pmol (F) de oligonucleótidos.

Estos resultados permitieron definir el número de ciclos idóneo para cada DNac en las dos regiones como se indica en la tabla 3.

TABLA 3
CICLOS DE PCR EN LOS QUE LA REACCIÓN SE HALLA EN LA FASE LOGARÍTMICA

<i>DNAc</i>	<i>Hipocampo anterior</i>	<i>Hipocampo posterior</i>
<i>proTRH</i>	31	29
<i>TRH R1</i>	32	33
<i>TRH R2</i>	31	34
<i>PP II</i>	26	30
<i>GR</i>	30	29
<i>Ciclofilina</i>	20	22

B. ENTRENAMIENTO EN EL LABERINTO DE MORRIS

Las ratas fueron entrenadas por 1, 3 ó 5 días y sacrificadas 5, 30 ó 60 minutos después del último entrenamiento; excepto al tercer día en el que no hubo grupo sacrificado a los 5 minutos.

La latencia a encontrar la plataforma escondida es el tiempo que las ratas tardan en escapar del agua desde que son introducidas al laberinto. Éste parámetro disminuye conforme las ratas aprenden la ubicación de la plataforma, por lo que representa una medida del aprendizaje espacial. En la figura 9 se muestra la latencia promedio para cada ensayo en cada día del entrenamiento. El análisis de varianza para el primer día mostró una disminución estadísticamente significativa en la latencia de los tres grupos con el transcurso de los ensayos (entrenados 1 día: $F=8.913$, $p<0.0001$; entrenados 3 días: $F=4.13$, $p=0.0001$; entrenados 5 días: $F=18.652$, $p<0.0001$); lo mismo ocurrió al segundo día para los grupos restantes (entrenados 3 días $F=4.3$, $p<0.0001$ y 5 días $F=6.787$, $p<0.0001$). En los días 1 y 2 el primer y segundo ensayos fueron distintos a los 8 restantes.

El grupo de animales entrenados por 5 días mostró un efecto del entrenamiento en la latencia al cuarto y quinto día ($F=3.776$, $p=0.0002$ y $F=4.59$, $p<0.001$ respectivamente), el cual se debió, en ambos días, a una diferencia entre el primer ensayo y los 9 restantes ($p<0.05$). No hay diferencia entre el cuarto y el quinto día, pero estos dos sí fueron diferentes a los 3 días anteriores, es decir, en los últimos dos días no mejora más el desempeño de la rata.

Latencia a encontrar la plataforma en el laberinto de Morris

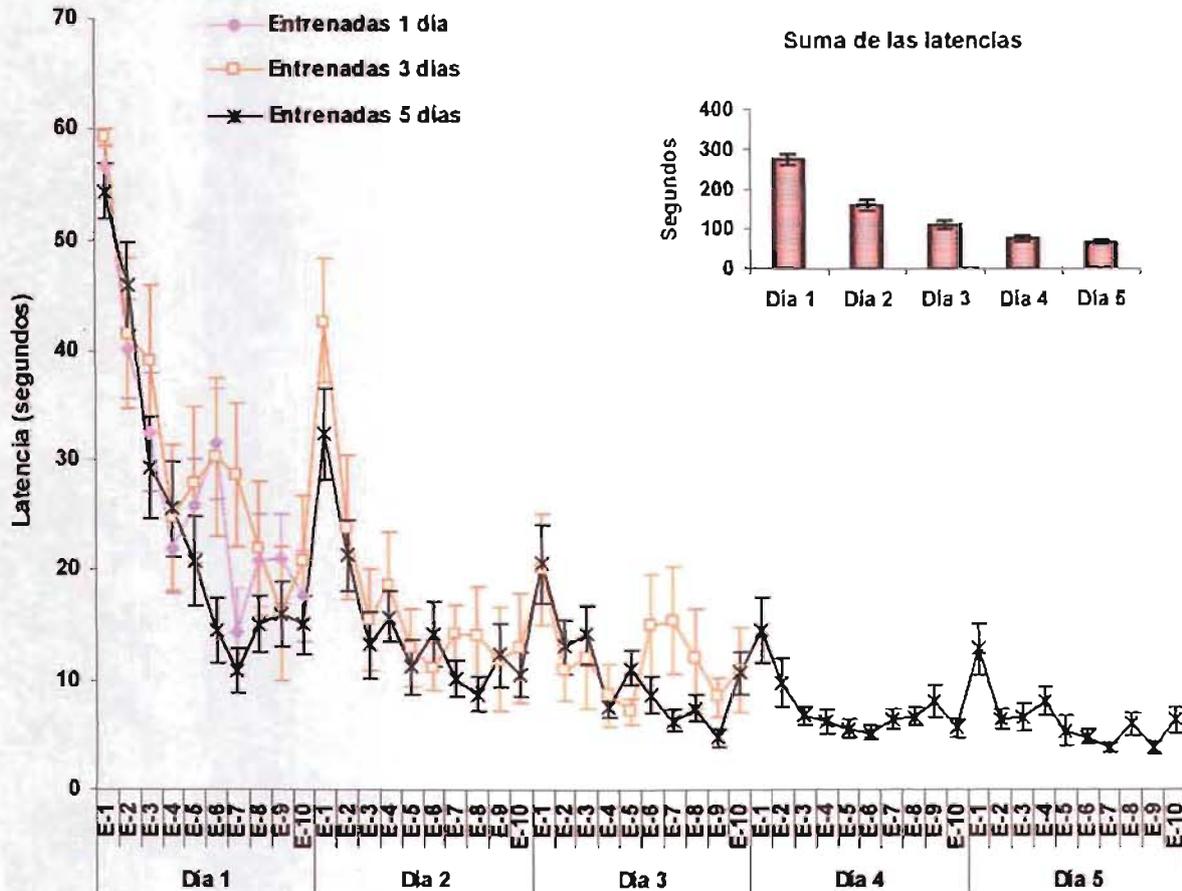


Figura 9. Latencia a encontrar la plataforma escondida en la tarea espacial del laberinto de Morris. El entrenamiento produjo una reducción significativa de la latencia en los primeros tres días. No hay mejora en el desempeño entre los días 4 y 5. No hay diferencia en cada día entre los tres grupos. Cada punto representa la media aritmética de la latencia de 12 animales (\pm error estándar de la media). Entrenadas 1 día $n=19$, entrenadas 3 días $n=12$ y entrenadas 5 días $n=26$. Recuadro: suma de las latencias de los 10 ensayos de cada día. Promedio \pm error estándar de la media.

C. CAMBIOS DE LA EXPRESIÓN DE ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN TRHÉRGICA ASOCIADOS A LA TAREA ESPACIAL

Se realizaron dos experimentos independientes para determinar la cinética de cambios en la expresión del TRH y los RNA mensajeros del proTRH, sus receptores y la PPII, en busca de indicios de la participación (activación o inhibición) de las neuronas TRHérgicas en los procesos de memoria espacial mediados por el hipocampo.

2. TRH

El contenido de TRH de un tejido es el resultado de la síntesis (transcripción y traducción), procesamiento, transporte y liberación de las terminales sinápticas. Un incremento puede ser el resultado de la inhibición de la liberación o un aumento en la síntesis y/o procesamiento del péptido; en contraparte un decremento refleja liberación o disminución en la síntesis (Joseph-Bravo, et al, 1998). Para discernir entre los escenarios posibles ante un descenso o incremento, los datos de contenido pueden correlacionarse con la cantidad de RNAm en la zona estudiada (Joseph-Bravo, et al, 1998), siempre y cuando se conozca la ubicación de los cuerpos celulares de las neuronas a las que se mide el contenido.

En la figura 10 se muestra el contenido de TRH en el hipocampo de ratas que fueron entrenadas por 5 días y sacrificadas 5, 30 y 60 minutos después.

La cinética de cambios fue distinta entre la zona anterior (dorsal) y la posterior (dorsal y ventral) del hipocampo (Figura 10). El ANOVA de dos vías para la zona anterior y para la zona posterior reveló un efecto significativo del grupo experimental ($F=5.996$ y $p<0.01$ [anterior]; $F=5.19$ y $p>0.05$ [posterior]), del tiempo ($F=9.259$ [anterior] y $p<0.01$; $F=3.77$ y $p<0.05$ [posterior],) y una interacción entre ambas fuentes de variación sólo en la región anterior ($F=5.173$ y $p<0.01$). El análisis pos hoc (Fisher) mostró que a los 5 y 30 minutos en la porción anterior, no hubo diferencia entre el control de nado y los animales entrenados, mientras que en la región posterior los animales entrenados tuvieron una concentración de TRH significativamente menor a los 30 min ($p<0.05$). A los 60 minutos los animales entrenados tuvieron más del doble de TRH en la porción anterior que el control de nado ($p<0.05$), mientras en la región posterior las diferencias entre grupos ya no fueron significativas, aunque se conserva la tendencia de haber menos TRH en los animales entrenados.

Contenido de TRH

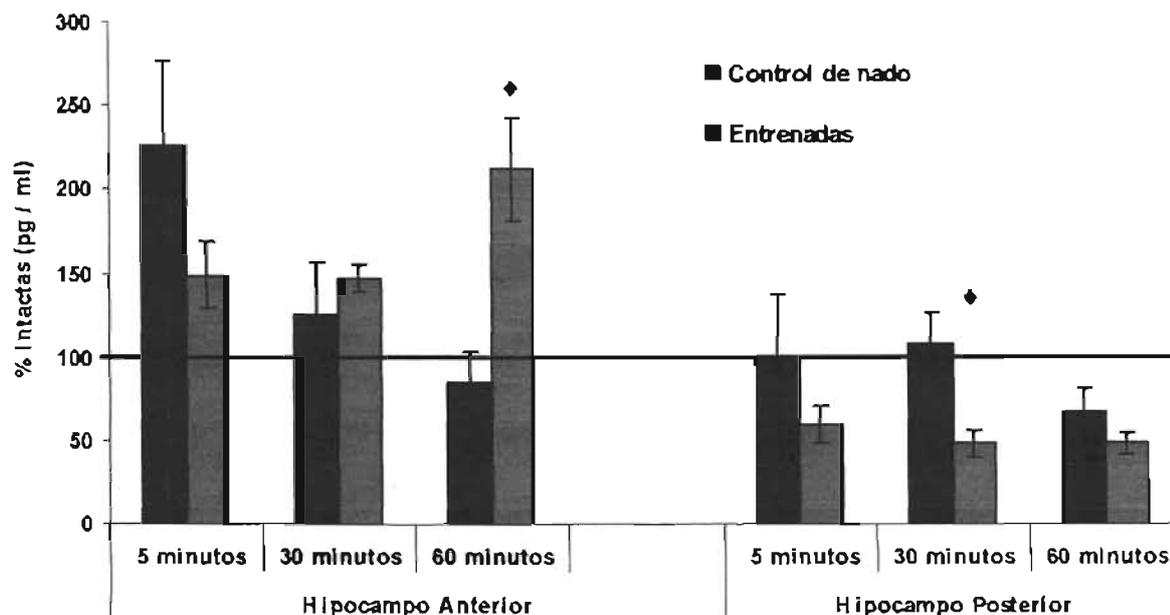


Figura 10. Contenido de TRH (pg/ml) en las porciones anterior y posterior del hipocampo. El TRH fue medido sólo en los animales entrenados por 5 días. ♦ $p < 0.05$ (control de nado vs entrenadas); $n = 6$ / grupo.

En las figuras 11 y 12 se muestran los niveles de expresión del RNAm del proTRH en las regiones anterior y posterior del hipocampo de ratas entrenadas y el de las usadas como control de nado.

En el hipocampo anterior el único cambio estadísticamente significativo ocurrió a los 30 minutos del tercer día, cuando las ratas entrenadas expresaron 49% menos RNAm del proTRH que el grupo control de nado (Figura 11). En el resto de los tiempos el mensajero del prepro péptido en las ratas entrenadas mostró fuertes tendencias a incrementar o disminuir, la dispersión en los datos evitó que las diferencias resultaran significativas. Destaca el primer día en el cual a los cinco minutos los animales entrenados parecían tener menos RNAm del prepro péptido que los controles de nado, a los 30 minutos esa diferencia desapareció y a una hora post-entrenamiento las ratas entrenadas tendieron a presentar más del RNAm que las controles (Figura 11). Al quinto día, a los 5 y 60 minutos post-entrenamiento, los animales entrenados tendieron a presentar más RNAm (Figura 11).

La región posterior del hipocampo no presentó, a los días 1 y 3, diferencia alguna en la expresión del RNAm del proTRH entre los grupos entrenado y control de nado (Figura

12). Es al quinto día, a los 30 y 60 minutos, en el que los animales entrenados expresaron 60 y 69% más del RNAm del prepro péptido; esta diferencia del quinto día resultó estadísticamente significativa (Figura 12).

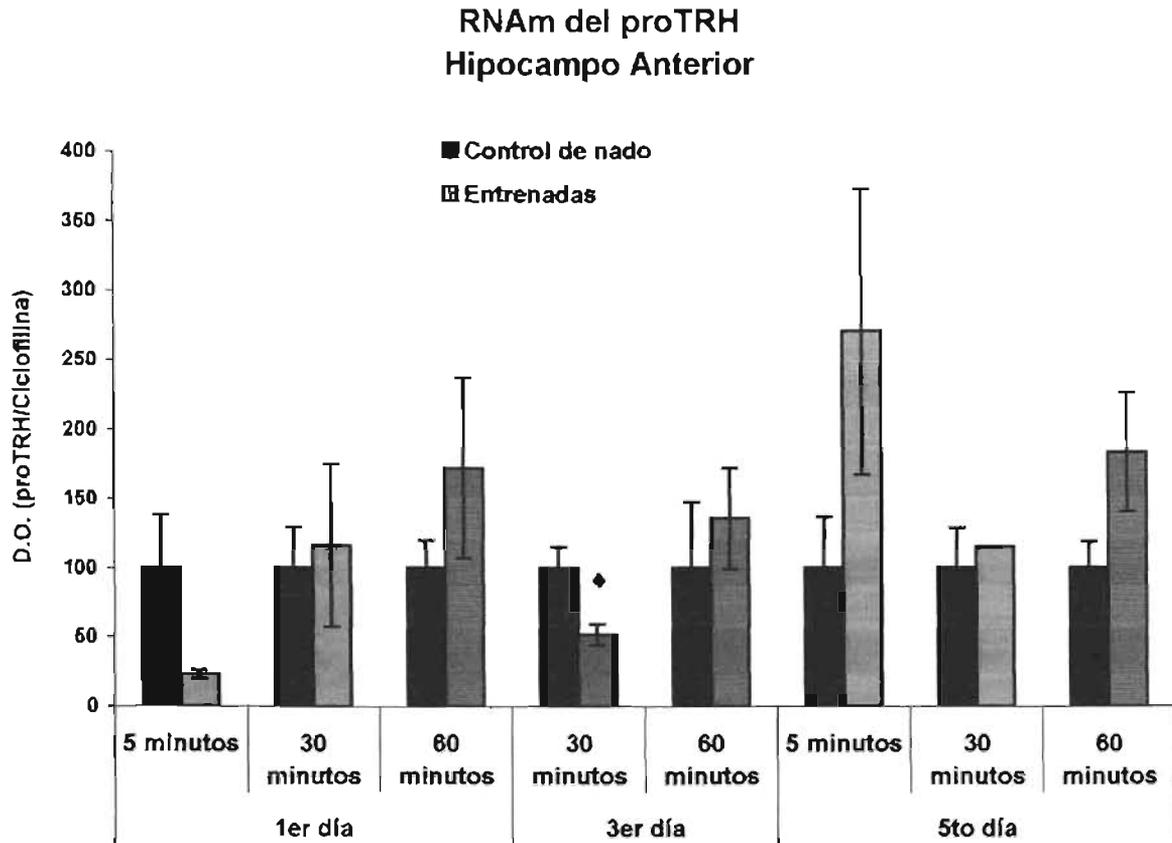


Figura 11. Expresión del RNAm (medida por RT-PCR) del proTRH en la región anterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris. Los animales fueron sacrificados 5, 30 y 60 minutos después del primer, tercer o quinto día de entrenamiento. El valor cuantificado del RNAm del proTRH está corregido con el de la ciclofilina y los valores del grupo entrenado están expresados como la fracción porcentual del control de nado. En todos los casos cada punto representa la media aritmética y el error estándar de la media. ♦ $p < 0.05$ vs Control de Nado; $n=12$ / grupo.

RNAm del proTRH Hipocampo Posterior

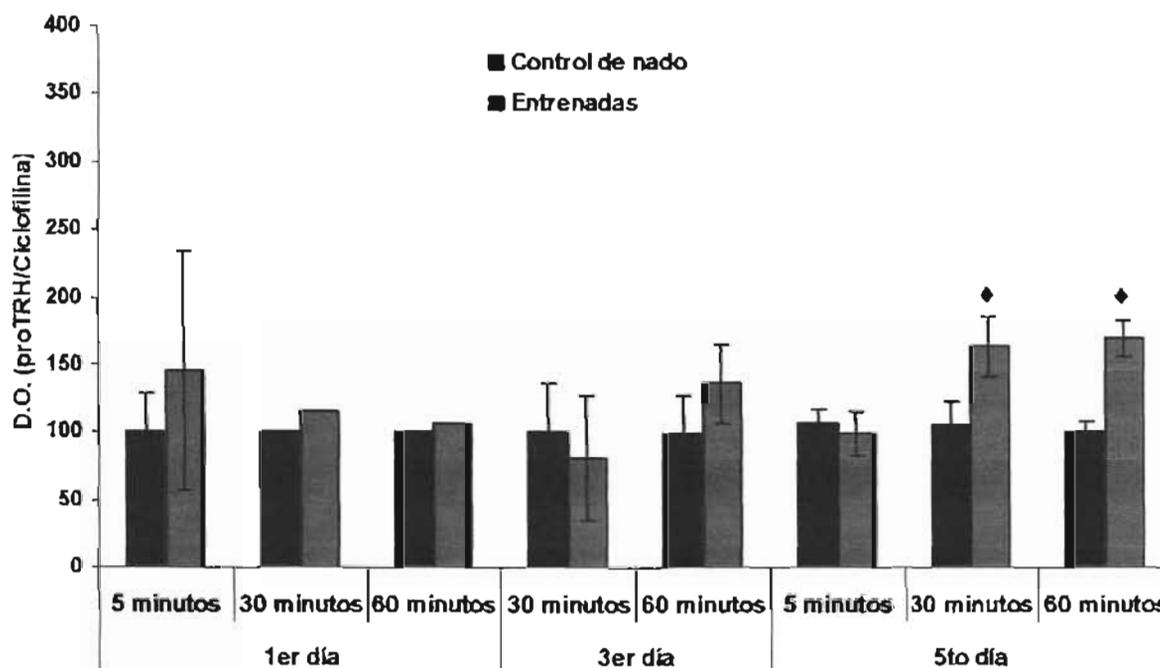


Figura 12. Expresión del RNAm del proTRH en la región posterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris. Los animales fueron sacrificados 5, 30 y 60 minutos después del primer, tercer o quinto día de entrenamiento. El valor cuantificado del RNAm del proTRH está expresado como en la figura 10. En todos los casos cada punto representa la media aritmética y el error estándar de la media. ♦ $p < 0.05$ vs Control de Nado; $n = 12$ / grupo.

3. TRH R1

El RNAm del TRH R1 fue medido en la porción anterior del hipocampo únicamente en uno de los dos experimentos, en el cual no hay animales sacrificados 5 minutos después del último entrenamiento. En la figura 13 se muestran los resultados obtenidos. El primer día no hubo diferencia alguna entre los grupos entrenados y su respectivo control de nado. Al tercer día, a los 30 minutos, el grupo de ratas entrenadas presentó 108% más RNAm del TRH R1 que su respectivo control de nado ($p > 0.05$, figura 13), mientras que a los 60 minutos los valores fueron similares entre las ratas entrenadas y los controles. Al quinto día la situación a los 30 minutos era inversa a la del día 3, es decir, el control de nado tenía 2.27 veces más RNAm del R1 que las entrenadas ($p < 0.05$); tal diferencia también desapareció a los 60 minutos.

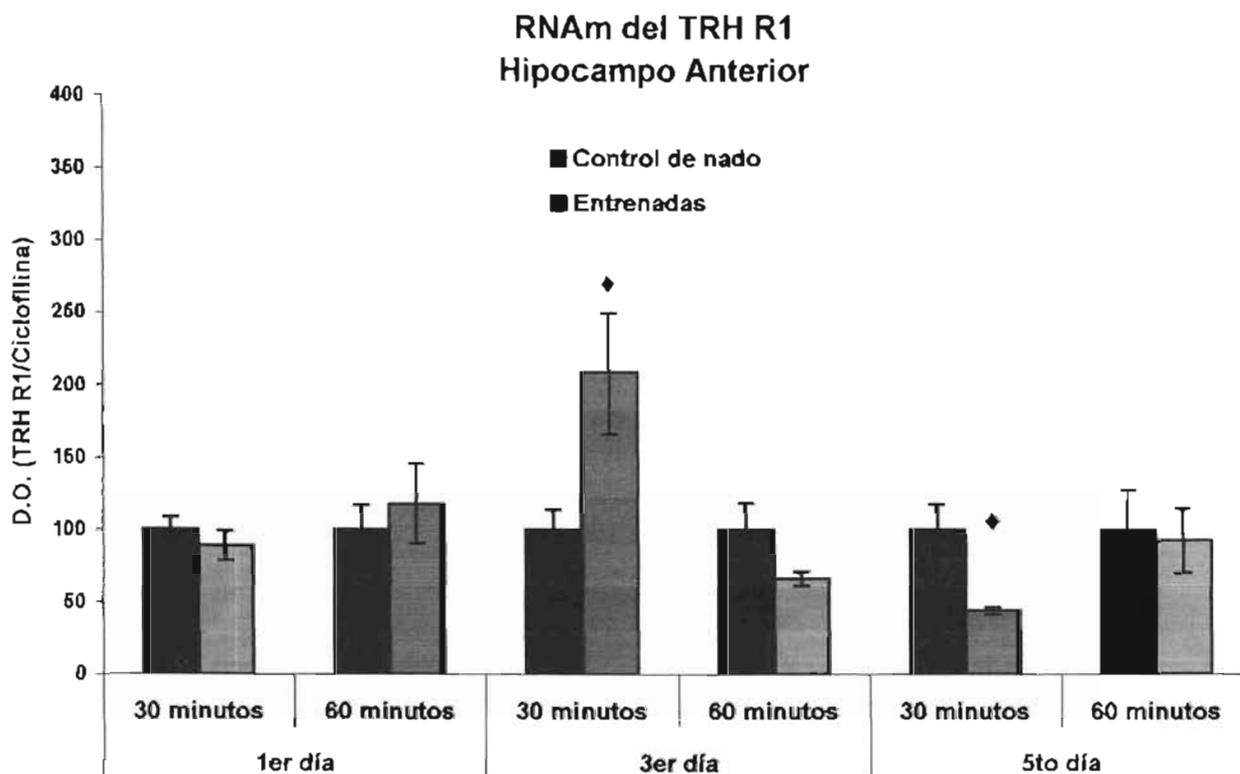


Figura 13. Expresión del RNAm del TRH R1 en la región anterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris. El valor cuantificado del RNAm del TRH R1 está corregido por el de ciclofilina y los valores están expresados como la fracción porcentual del control de nado. Cada punto representa la media y el error estándar de la media. ♦ $p < 0.05$ vs Control de Nado; $n=6$ / grupo.

Del hipocampo posterior se presentan los datos de los dos experimentos y de todos los grupos (Figura 14). Las únicas diferencias estadísticamente significativas, con los respectivos controles de nado, fueron a los cinco (-36%) y 60 minutos (+50%) en el grupo de ratas entrenadas por cinco días, comparado ($p < 0.05$).

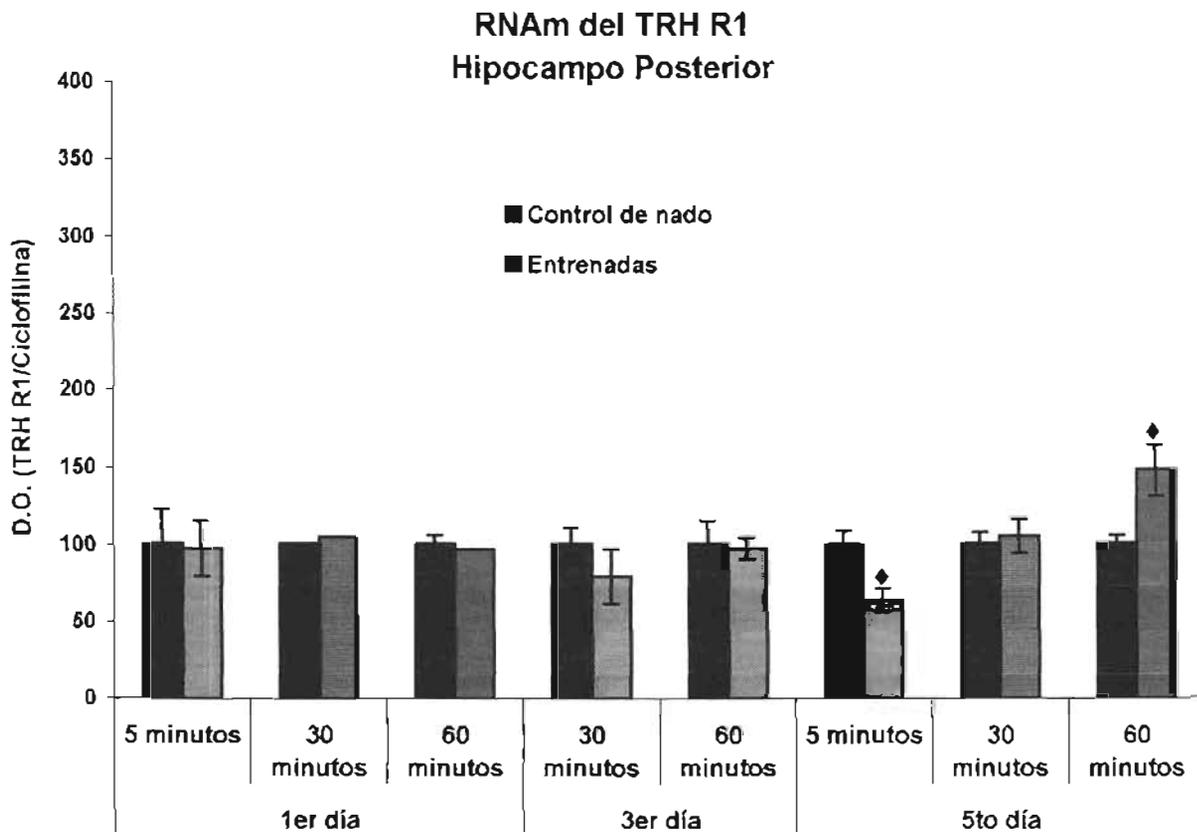


Figura 14. Expresión del RNAm del TRH R1 en la región posterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris. El valor cuantificado del RNAm del TRH R1 está corregido con el de la ciclofilina y los valores del grupo entrenado están expresados como la fracción porcentual del control de nado. Cada punto representa la media aritmética y el error estándar de la media. ♦ $p < 0.05$ vs Control de Nado; $n = 12$ / grupo.

Dado que a los 60 minutos del 5to día parecen ocurrir cambios más reproducibles tanto en la expresión del RNAm del proTRH como los del TRH R1, se decidió analizar, con hibridación *in situ*, los cambios en el RNAm del TRH R1. Se utilizaron ratas entrenadas por 5 días y sacrificadas a los 60 minutos, midiendo los cambios en diversas regiones de la formación hipocampal.

En la figura 15 se muestra la densidad óptica en las distintas regiones del hipocampo. En el giro dentado y CA3 izquierdos se observó, a lo largo de toda la zona analizada (desde -5.14mm hasta -5.5mm del Bregma), al menos una tendencia a presentar más RNAm en los animales entrenados, la cual alcanza a ser estadísticamente significativa solo en la porción dorsal del giro dentado ($p < 0.05$). Los controles habituados también presentan diferencias de expresión entre los dos hemisferios, siendo menor en el izquierdo

que en el derecho, y en el dominio CA3 izquierdo tendió a ser aún menor que la del grupo de animales entrenados.

Del lado derecho la situación fue distinta, ni en CA3 ni en el giro dentado hay diferencia alguna entre el control de nado y los entrenados. En los controles habituados la expresión del RNAm del receptor es mayor que en cualquiera de los grupos con zambullidas en el laberinto.

Parece entonces que el hemisferio izquierdo de la formación hipocampal está respondiendo más específicamente a la tarea espacial que el derecho.

Los datos obtenidos por medición en el film parecían estar ligeramente saturados pues la diferencia entre la porción ventral y dorsal del giro dentado no fue tan marcada como se ha reportado (Heuer, et al, 2000); por lo tanto se midió la señal de las laminillas cubiertas por la emulsión autoradiográfica (Figura 16).

Nuevamente el hemisferio izquierdo mantuvo la tendencia de tener más RNAm del R1 en el grupo de animales entrenados comparado al control de nado (Figura 16B) siendo la porción dorsal la más afectada, pues los niveles de expresión en el control de nado son casi nulos y en los animales entrenados se incrementa la expresión (Figura 16A1 y A2).

De éstas diferencias, sólo la que ocurrió en la zona dorsal del giro dentado resultó estadísticamente significativa ($p < 0.05$). En el hemisferio derecho no hay ningún efecto significativo del entrenamiento en el laberinto (Figura 16B). Como en el film, los controles habituados tendieron a presentar, en el hemisferio derecho, más RNAm que los grupos control de nado y entrenados (Figura 16B).

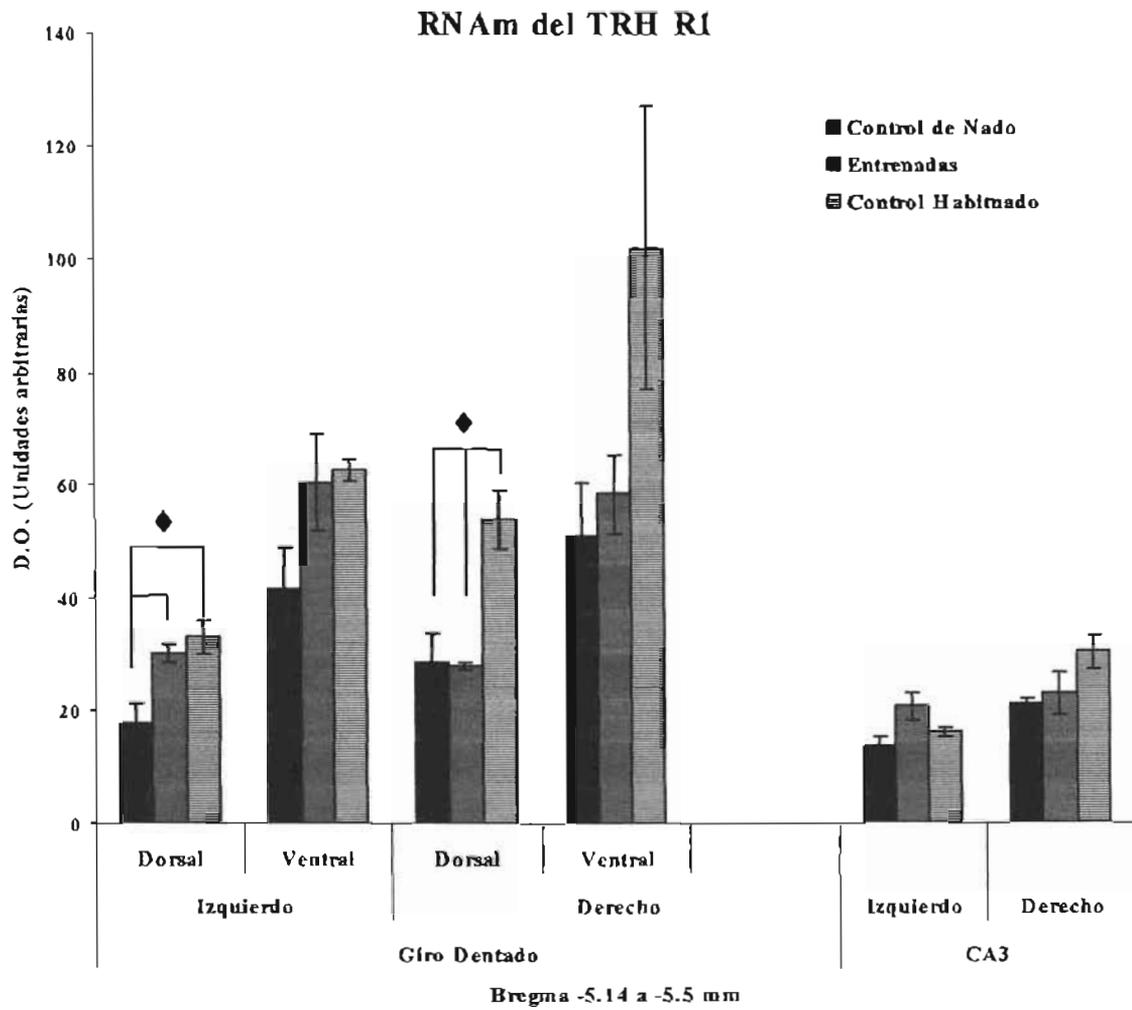


Figura 15. Cuantificación *in situ* del RNAm del TRH R1 en la formación hipocámpal (film autoradiográfico) de ratas entrenadas por 5 días y sacrificadas 60 minutos después. ♦ $p < 0.05$; $n=3$ / grupo.

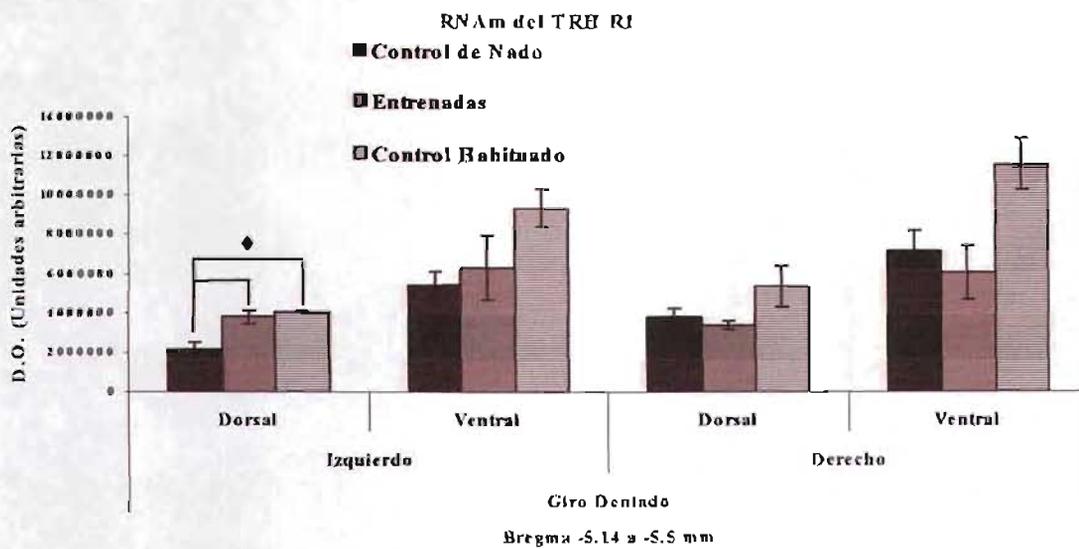
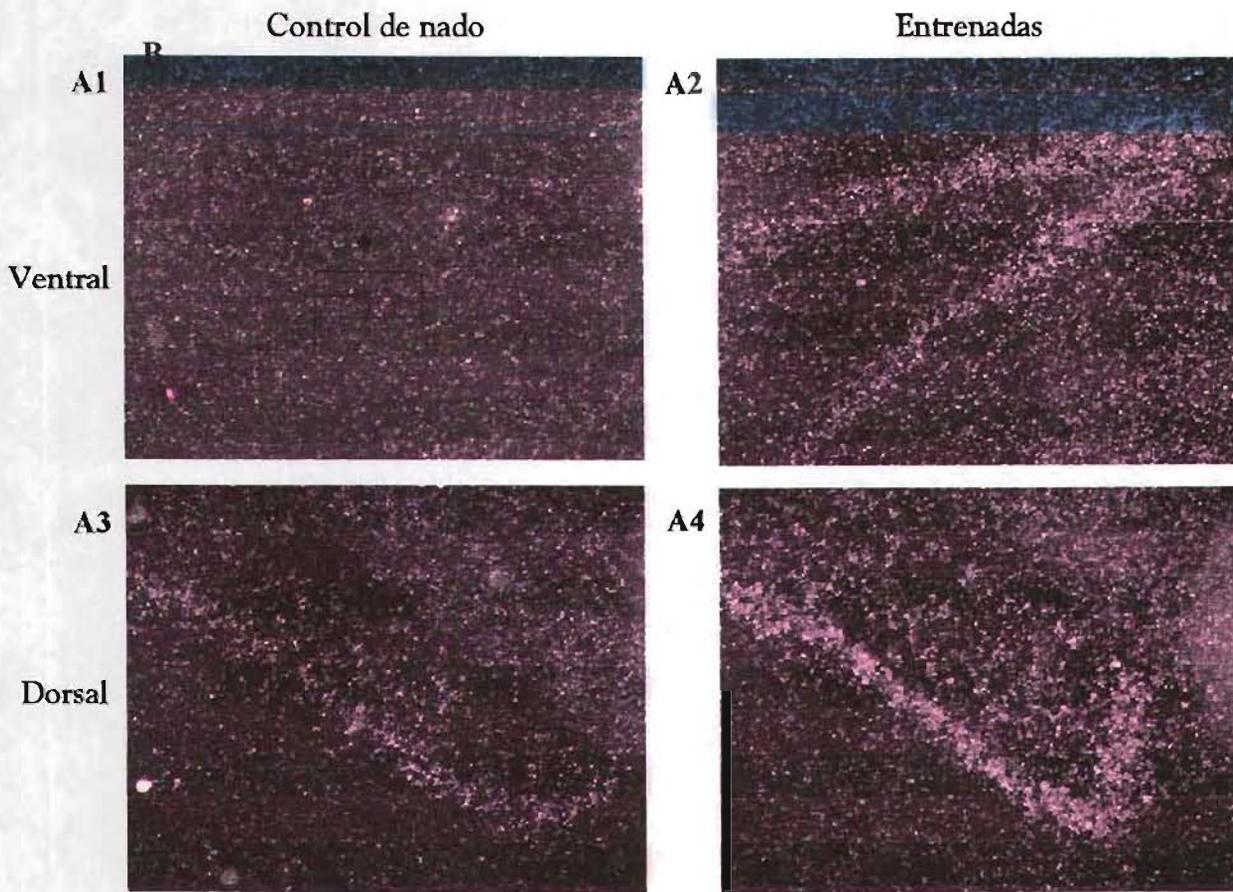


Figura 16. RNAm del TRH R1 en el giro dentado de ratas entrenadas en el laberinto de Morris por 5 días y sacrificadas 60 minutos después. A) Imágenes de campo oscuro del giro dentado izquierdo dorsal (A1 y A2) y ventral (A3 y A4). B) Cuantificación de la densidad óptica en laminillas cubiertas de emulsión autoradiográfica los hemisferios izquierdo y derecho. ♦ $p < 0.05$; $n = 3$ / grupo.

4. TRH R2

Las mediciones del RNAm del TRH R2 se realizaron sólo en el experimento en el que se midió el RNAm del TRH R1 en el hipocampo anterior.

A los 30 minutos después del primer día de entrenamiento, las ratas que aprendieron la localización de la plataforma presentaron una tendencia a tener los niveles de RNAm de R2 74% más altos que el control de nado en la porción anterior (Figuras 17A), mientras que a los 60 minutos la situación se invirtió, estando las ratas entrenadas 62% por debajo de los controles de nado.

Al tercer día, a los 30 minutos, los animales entrenados presentaron un incremento muy fuerte del RNAm del R2, que equivale a 312% más que el control de nado ($p < 0.05$ vs control de nado), tal diferencia desapareció a los 60 minutos. Al quinto día no se presentaron diferencias estadísticamente significativas.

En el hipocampo posterior (donde no fue posible analizar el grupo de 1 día sacrificadas a los 60 minutos) sólo se presentó un cambio relevante a los 30 minutos del primer día (Figura 17B) cuando 3 de los 4 controles de nado analizados presentaron niveles indetectables de RNAm del TRH R2, mientras que en el cuarto, que se presenta en la gráfica 17B, el nivel de expresión del RNAm del TRH R2 es 3 veces menor que en los animales entrenados. Debido a la ausencia de expresión en tres de los animales control tal cambio no fue evaluado estadísticamente.

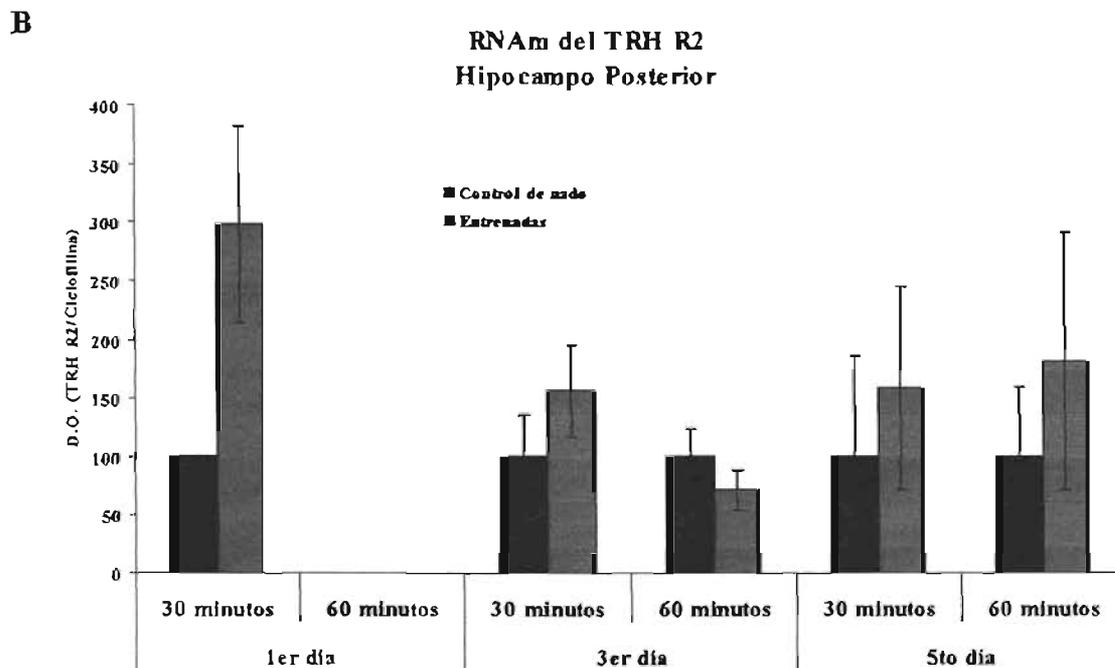
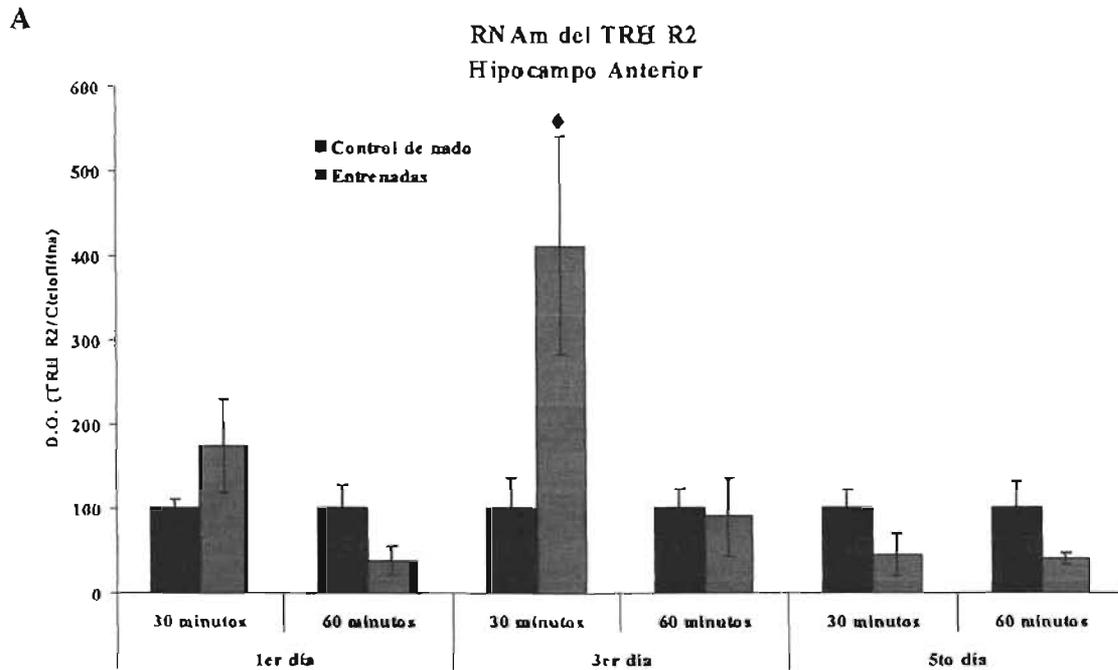


Figura 17. Expresión del RNA_m del TRH R2 en la región posterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris y sacrificadas 30 y 60 minutos después del 1er, 3er y 5to día de entrenamiento. El valor cuantificado del RNA_m del TRH R2 está corregido con el de la ciclofilina y los valores del grupo entrenado están expresados como la fracción porcentual del control de nado. A) Hipocampo anterior y B) posterior. Cada punto representa la media aritmética con el error estándar de la media. ♦ $p < 0.05$ vs Control de Nado; $n=6$ / grupo.

5. PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II (PPII)

El RNAm del último elemento de la transmisión TRHérgica, la PPII, fue analizado en ratas del mismo experimento en el que se midió el del TRH R2. Ni en la región anterior (Figura 18) ni en la posterior (Figura 19) se presentaron cambios significativos, excepto el grupo entrenado por un día y sacrificado 30 minutos después, el cual, en la región anterior mostró una tendencia a tener más RNAm de la PPII que los controles de nado (Figura 18); en la región posterior, los mismos animales entrenados mostraron 44% más RNAm que el control de nado ($p < 0.05$ vs control de nado, figura 19).

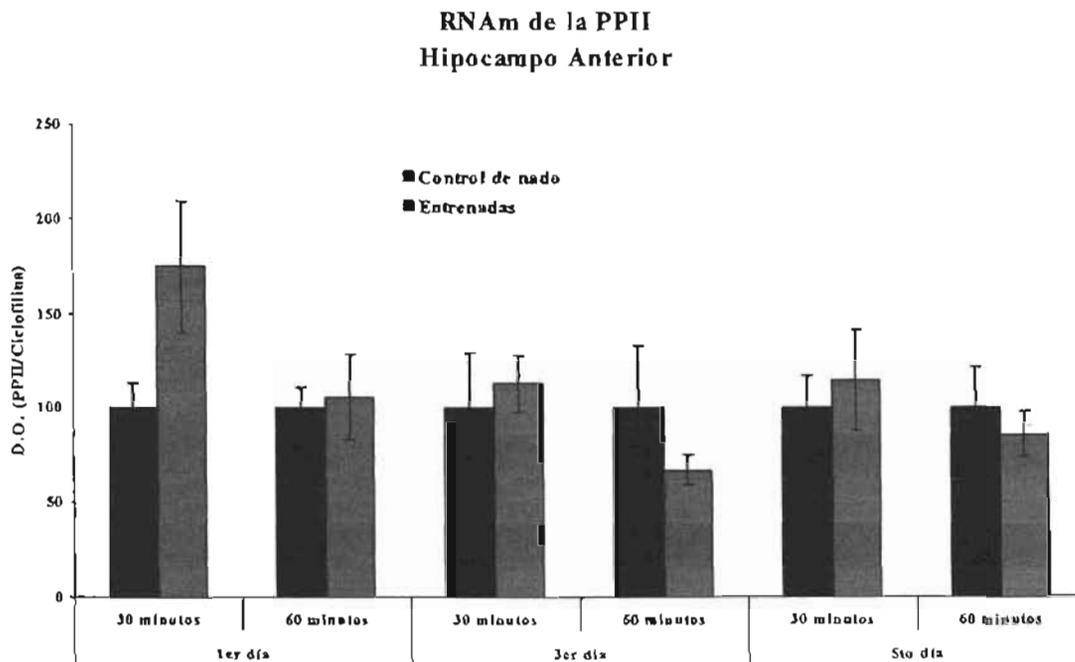


Figura 18. Expresión del RNAm de la PPII en la región anterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris y sacrificadas 30 y 60 minutos después del 1er, 3er o 5to día de entrenamiento. El valor cuantificado del RNAm de la PPII está corregido con el de la ciclofilina y los valores del grupo entrenado están expresados como la fracción porcentual del control de nado. Cada punto representa la media aritmética con el error estándar de la media; $n=6$ / grupo.

**RNAm de la PPII
Hipocampo Posterior**

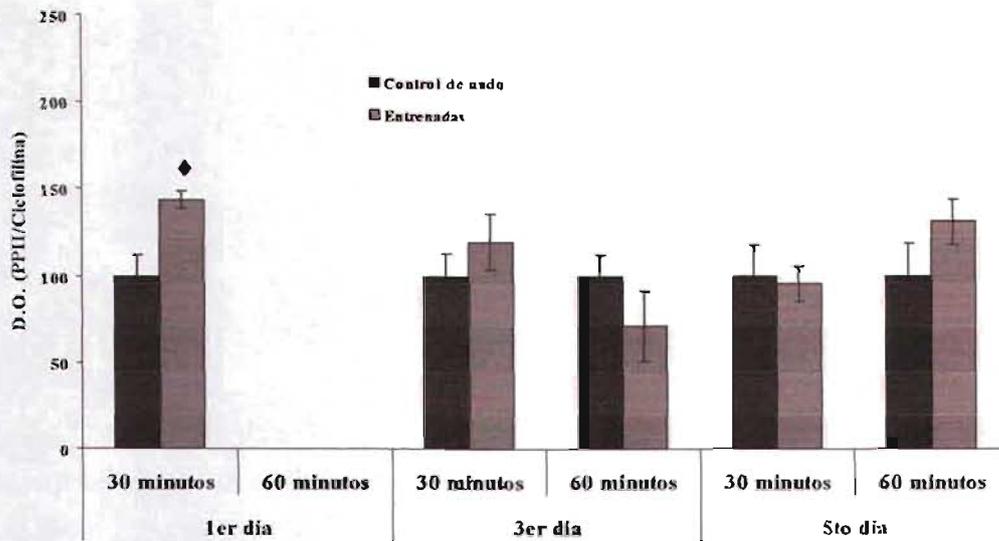


Figura 19. Expresión del RNAm de la PPII en la región posterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris y sacrificadas 30 y 60 minutos después del 1er, 3er o 5to día de entrenamiento. Cada punto representa la media aritmética con el error estándar de la media. ♦ $p < 0.05$ vs Control de Nado; $n = 6$ / grupo.

En la tabla 4 se resume los cambios encontrados en la expresión de TRH y los RNAm de los elementos de transmisión TRHérgica (entrenadas vs. control de nado).

		TRH			TRHR1			TRHR2		PPII	
		5'	30'	60'	5'	30'	60'	30'	60'	30'	60'
1 día	HA	=	=	=	•	=	=	=	=	=	=
	HP	=	=	=	=	=	=	↑↑	•	↑	•
3 días	HA	•	↓	=	•	↑	=	↑↑	=	=	=
	HP	•	=	=	•	=	=	=	=	=	=
5 días	HA	=	=	=	•	↓	=	=	=	=	=
	HP	=	↑	↑	↓	=	↑	=	=	=	=

Las flechas representan las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) de los animales entrenados comparados a los controles de nado (una flecha, diferencia $\leq 100\%$ y dos flechas $> 100\%$). HA, hipocampo anterior; HP, hipocampo posterior. •, no determinado; =, no hay diferencia significativa.

D. GLUCOCORTICOIDES EN SUERO Y RNAm DEL RECEPTOR DE
GLUCOCORTICOIDES (GR) EN HIPOCAMPO

6. CORTICOSTERONA

Los niveles de CT circulantes fueron medidos mediante radioinmunoensayo. Los resultados de tales mediciones son presentados en la figura 20. El ANOVA reveló que sólo el factor tiempo (transcurso del entrenamiento) resultó significativo ($F=18.35$ y $p<0.01$), mientras que no hubo diferencias que pudieran atribuirse al grupo experimental o a la interacción del tiempo con el grupo.

Cada día, el nivel más alto de corticosterona ocurrió a los 30 minutos después del entrenamiento. Al quinto día los niveles de corticosterona a los 30 minutos tendieron a ser menores que los del primer día e iguales a los de ratas intactas o a los del grupo de animales entrenados por 4 días y sacrificados 24 horas después sin someterlos a la prueba (Figura 20). Estos resultados sugieren una habituación al estrés de la prueba.

Corticosterona en plasma

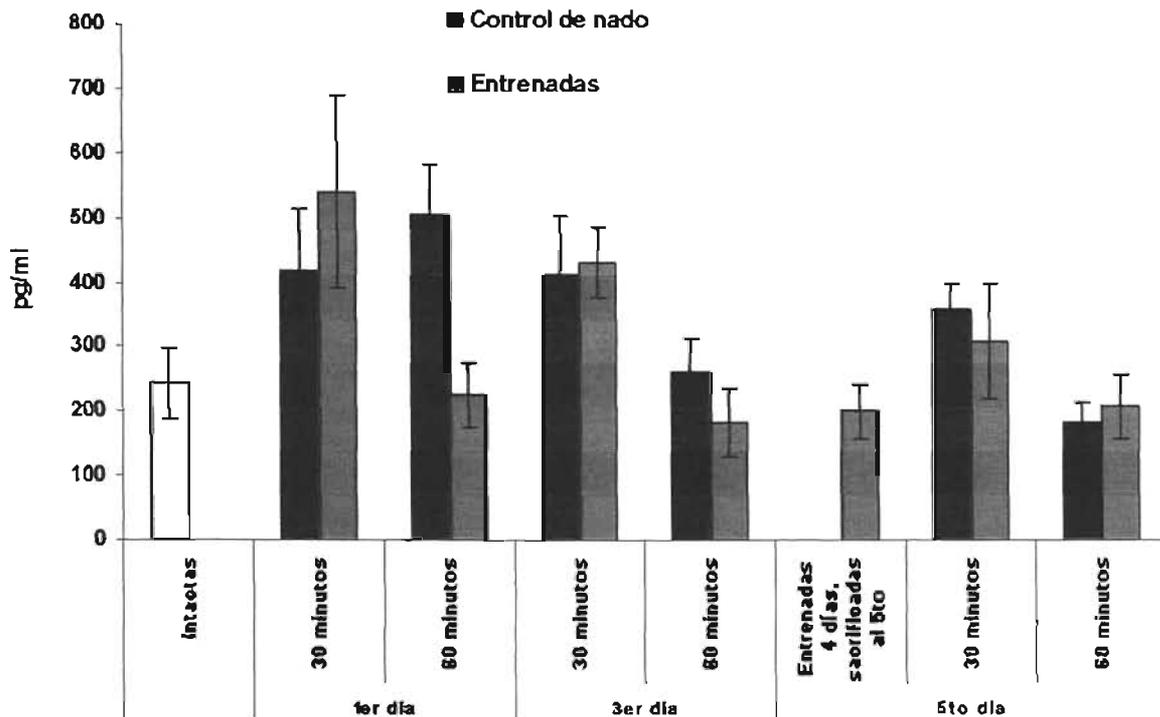


Figura 20. Niveles de corticosterona en el plasma sanguíneo. Los datos están expresados como pico gramos por mililitro. En todos los casos cada punto representa la media aritmética y el error estándar de la media; $n=6$ / grupo.

7. GR

Se midieron los niveles del RNAm del receptor de glucocorticoides (GR), ya que la expresión de este RNAm disminuye en el hipocampo de ratas macho cuando son sometidas a estrés por nado (corto plazo) o inmovilización y nado a largo plazo (Karandrea, et al, 2002). Esta regulación puede ocurrir directamente a través de los niveles circulantes de glucocorticoides, pues la cantidad de RNAm (en hipocampo) está incrementada en ratas adrenalectomizadas y disminuida cuando hay altas concentraciones de corticosterona en sangre (Herman y Spencer, 1998; Karandrea, et al, 2002).

El ANOVA para los valores de expresión del RNA mensajero del GR en la porción anterior del hipocampo mostró que no había ningún efecto estadísticamente significativo (Figura 21). En cambio, en la región posterior hubo un fuerte efecto del tiempo ($F=18.346$ y $p<0.0001$), no así del grupo experimental ni por interacción entre el grupo y el tiempo (Figura 22); estos datos, en conjunto con los de CT circulante, indican que los animales entrenados y los controles de nado respondieron de forma similar al estrés del nado forzado en el laberinto de Morris.

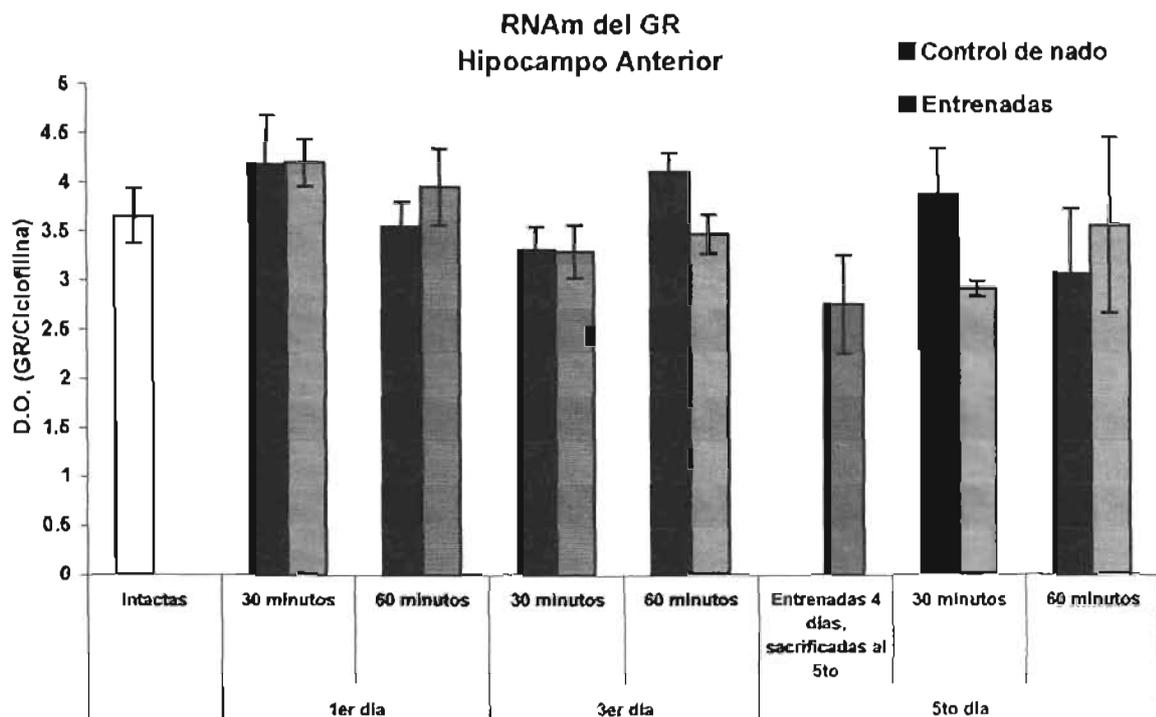


Figura 21. Expresión del RNAm del GR en la región anterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris. Cada punto representa la media aritmética y el error estándar de la media; $n=6$ / grupo.

Además, en la zona posterior, al comparar la expresión del RNAm del GR de los animales intactos contra los grupos control de nado y entrenados del primer día y los del tercer día sacrificados a los 30 minutos, resulta evidente una disminución de éste RNAm en los animales sometidos a la prueba. Esta disminución no ocurrió en el resto de los grupos (1er día = 3er día 30 minutos < intactos \approx 4to día = 5to día) (Figura 22). En las ratas entrenadas por 4 días y sacrificadas al 5to día, las niveles de CT y GR en hipocampo posterior son como los de las intactas, indicando que los cambios que detectamos en la activación del eje HPA en los primeros días son transitorios.

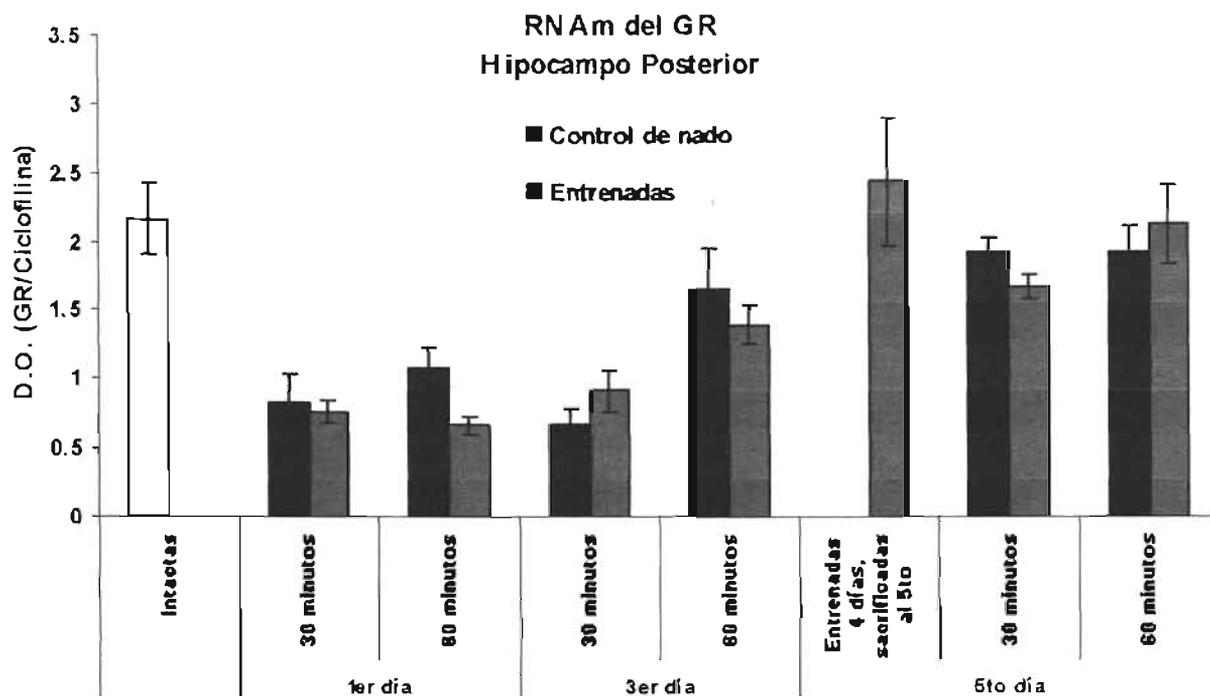


Figura 22. Expresión del RNAm del GR en la región posterior del hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto en agua de Morris. Cada punto representa la media aritmética y el error estándar de la media; n=6 / grupo.

E. CORRELACIONES CON PARÁMETROS CONDUCTUALES Y DEL ESTRÉS

La suma del tiempo requerido para encontrar la plataforma en un día en particular es una medida del aprendizaje. La latencia del primer ensayo (a partir del segundo día) refleja el recuerdo de la experiencia del día previo y por lo tanto la recuperación de información almacenada 24 horas antes (memoria a largo plazo), en cambio la latencia del último ensayo de cada día refleja el aprendizaje del día en curso (memoria a corto plazo). La

corticosterona, cuya concentración en plasma es resultado de la actividad del eje HPA, es un reflejo del estado de estrés del animal.

Una correlación positiva con el tiempo de la latencia (del 1° ó 10° ensayo o la suma) indica que las ratas que mejor aprenden o recuerdan la tarea presentan menor concentración del RNAm medido, mientras que una negativa muestra que con mejor aprendizaje concurren mayores niveles de la molécula en cuestión.

Al comparar los valores de expresión de los genes medidos con alguna de las medidas descritas se encontró lo siguiente:

Si se contrasta la figura de los niveles de corticosterona (Figura 20) con la de RNAm del GR en el hipocampo posterior (Figura 22) puede verificarse que a mayor concentración de corticosterona, menor es la expresión de GR. El análisis de correlación entre ambas variables mostró un índice negativo, relativamente bajo ($r=-0.3$, figura 23), aunque estadísticamente significativo ($p<0.05$).

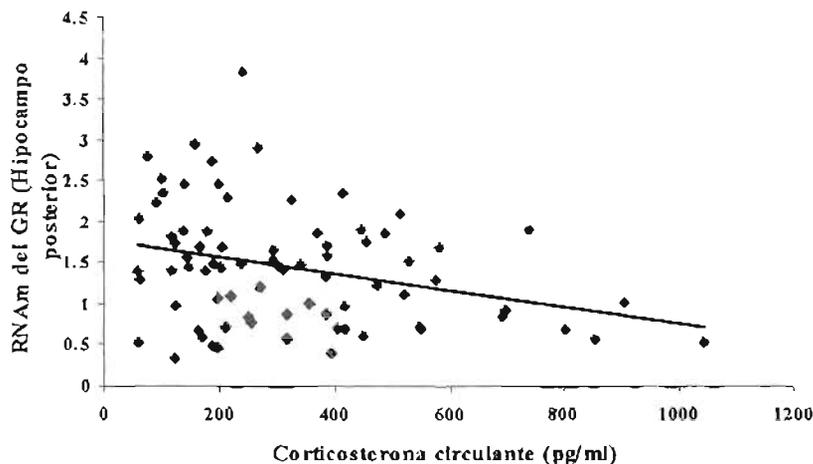


Figura 23. Correlación entre los valores de corticosterona circulante y la expresión del RNAm de GR en el hipocampo posterior. $r=-0.3$

La concentración sérica de CT correlaciona positivamente con la latencia de escape del décimo ensayo en el 1er (0.829), 3er (0.987) y 5to día (0.951).

En la zona anterior del hipocampo, al 5to día, la cantidad de RNA mensajero (medida a los 30 minutos) de proTRH, TRH R1, TRH R2 y PPI correlaciona positivamente con la suma de tiempo de ese día (Tabla 6). El RNAm del proTRH correlaciona con éste parámetro (suma de tiempo) desde el primer día (Tabla 6).

TABLA 6
CORRELACIÓN DE LOS ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN TRHÉRGICA EN EL CON LA SUMA DE LAS LATENCIAS DE TODOS LOS ENSAYOS DE CADA DÍA

		Σ del tiempo 1er día	Σ del tiempo 3er día	Σ del tiempo 5to día
<i>Hipocampo Anterior</i>	<i>proTRH</i>	0.712	0.841	0.792
	<i>TRH R1</i>			0.746
	<i>TRH R2</i>			0.757
	<i>PPII</i>			0.804
<i>Hipocampo Posterior</i>	<i>proTRH</i>			-0.917
	<i>TRH R1</i>			-0.719
	<i>TRH R2</i>	0.947	0.948	0.869
	<i>PPII</i>	0.907	0.896	

En la zona posterior del hipocampo (que incluye parte de la región dorsal y la ventral) los RNAm del proTRH y el del TRH R1 (en el 5to día) correlacionan negativamente con la suma del tiempo, de forma tal que en las ratas con mejor desempeño en la tarea hay una mayor concentración de estos RNA mensajeros (Tabla 6). En cambio los RNAm del TRH R2 y de la PPII correlacionan positivamente con la suma del tiempo al primer y tercer día (el RNAm del TRH R2 también al 5to día). Estos dos RNAm, al 3er y 5to día, también correlacionan positivamente con la latencia en el primer ensayo, es decir con la medida que refleja la memoria a largo plazo (Tabla 7). Al tercer día, también en la región posterior, los RNAm del GR, el TRH R2 y la PPII correlacionan positivamente con el tiempo del décimo ensayo (0.657, 0.704, 0.66 respectivamente).

TABLA 7
CORRELACIONES CON LA LATENCIA A ENCONTRAR LA PLATAFORMA EN EL PRIMER ENSAYO

<i>Hipocampo Posterior</i>	<i>Latencia del 1er ensayo 3er día</i>	<i>Latencia del 1er ensayo 5to día</i>
<i>TRH R2</i>	0.947	0.89
<i>PPII</i>	0.965	0.853

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

F. LOS CAMBIOS EN LA RESPUESTA AL ESTRÉS Y EN LOS ELEMENTOS DE LA TRANSMISIÓN TRHÉRGICA

En respuesta a un estímulo neuronal, existen cambios transitorios en la expresión génica. Por ejemplo, la expresión de genes inmediatos tempranos (como *c-fos*) se ha considerado como una señal de activación que ha permitido distinguir vías nerviosas activadas en respuesta a una condición determinada. Esto también se ha observado en la expresión de proteínas involucradas en la liberación regulada; en respuesta a un estímulo, la célula libera la hormona o neuromodulador y paralelamente, aumenta su síntesis (Joseph-Bravo, et al., 1998; Cote-Vélez, et al, 2005). Los cambios observados en el metabolismo del TRH neuronal en los modelos de “*kindling*” e ingesta de etanol, sugieren la participación de las células TRHérgicas (de Gortari, et al, 2000; de Gortari, et al, sometido); sin embargo, representan condiciones patológicas en las cuales se somete al animal a situaciones extremas. El objetivo del presente trabajo fue determinar si los parámetros involucrados en la función TRHérgica, se encontraban modificados en un modelo en el cual el animal realiza una tarea de aprendizaje espacial (el laberinto de agua de Morris); los cambios en la expresión podrían sugerir la participación del TRH en el aprendizaje. Los animales fueron sacrificados a distintos tiempos (5-60 min) al inicio, durante y al final del entrenamiento (1, 3 y 5 días) para evaluar los posibles cambios y si estos se relacionaban con el estrés (CT y GR) o el aprendizaje.

Fue evidente la habituación al estrés de la prueba ya que, al 5º día de entrenamiento, los niveles de CT y RNAm de GR no difirieron del control intacto. Sólo la expresión del RNAm del GR en la porción posterior del hipocampo varió recíprocamente con la cantidad de GC circulantes. Se ha reportado que ocurre un incremento agudo en la concentración de GC en plasma, después del ejercicio en regímenes de moderados a exhaustivos (Girard y Garland, 2002); en concordancia, en las ratas del presente estudio hay un mayor nivel de CT 30 minutos después del entrenamiento en los tres días evaluados, aunque la intensidad de esta respuesta tiende a disminuir conforme progresa el entrenamiento. La reducción de la respuesta refleja también la adaptación a las condiciones adversas de la tarea, de forma tal que al tercer día, a los 60 minutos post-entrenamiento, se observó un retorno de los niveles de CT a cantidades semejantes a las del control intacto (lo cual no ocurrió a los 60 minutos después del primer día de entrenamiento) y al 5to día, la elevación de CT después de la

prueba fue casi nula. El mismo comportamiento, pero en sentido opuesto al de la CT, se observó con el RNAm del GR en el hipocampo posterior.

La atenuación de la respuesta al estrés después del 3er día de entrenamiento, coincide con el momento en que las ratas alcanzan un nivel asintótico en el aprendizaje (no hay diferencia en el desempeño entre los días 4 y 5).

La concentración sérica de CT fue mayor en las ratas a las que les tomó más tiempo encontrar la plataforma en el décimo ensayo de cada uno de los días analizados. Se ha reportado la existencia de variaciones en las respuestas al estrés y en el desarrollo de la capacidad cognitiva de las ratas (Liu, et al, 2000; Weaver, et al, 2004). Algunas ratas tienen una respuesta menor del eje HPA ante un estrés de tipo psicológico, a la vez que presentan, en el hipocampo, mayor expresión del GR, del RNAm del BDNF y de algunas subunidades de los receptores tipo NMDA, así como una mayor liberación tónica de acetilcolina y un mejor desempeño en la tarea espacial del laberinto de Morris (Liu, et al 2000; Weaver, et al, 2004). Basado en esta evidencia, la correlación de la CT con la medida de la memoria a corto plazo (la latencia del 10° ensayo), podría estar reflejando esa variación natural en la respuesta al estrés y en el desempeño cognitivo; en concordancia, los niveles de GR en la porción posterior del hipocampo correlacionan negativamente con la concentración de CT circulante; es decir, cierto número de ratas tuvo una respuesta atenuada al estrés, mayores niveles del RNAm del GR en el hipocampo posterior y aprendió mejor la tarea. Dado que a ciertas concentraciones los GC's afectan la adquisición de tareas de aprendizaje (Roozendaal, 2003) y disminuyen la expresión de factores que lo favorecen (como el BDNF; Tapia-Arancibia, et al, 2004), es razonable pensar que en las ratas con menor respuesta al estrés, la CT no está afectando la función del hipocampo.

Con respecto a la expresión de los elementos de la transmisión TRHérgica, los cambios a los que nos hemos enfocado en este trabajo han sido las diferencias entre los grupos control de nado y los animales entrenados. Cuando las ratas son colocadas en un ambiente nuevo tienden a explorarlo (Save y Poucet, 2005). Durante los primeros minutos de la exploración las células piramidales del hipocampo comienzan a desarrollar patrones de disparo de potenciales de acción que dependen de la localización del animal en el espacio (las células de lugar) (O'Keefe y Dostrovsky, 1971), los cuales permanecen estables por semanas si el ambiente es constante (revisado en Morris, et al, 2003). Se ha postulado que estos patrones subyacen a la representación del espacio (revisado en Morris,

et al, 2003). Podría esperarse que los controles de nado estén formándose representaciones del espacio en el cual están nadando; sin embargo, a diferencia de los animales entrenados, las ratas controles de nado no aprenden que la información espacial es relevante para el escape del agua. Esta asociación de la información espacial con un sitio de escape en los animales entrenados, podría contribuir a los patrones desiguales de regulación que se encontraron en los elementos de la transmisión del TRH.

En el primer día, en ambas zonas del hipocampo, sólo fueron observados cambios en la expresión de los RNA mensajeros del TRH R2 y de la PPII en los animales entrenados en el laberinto de Morris y sacrificados 30 minutos después (sólo son significativos en la zona posterior). Esta diferencia, con respecto a los controles de nado, es transitoria al menos en la porción anterior, pues 30 minutos después desaparece para la PPII o incluso hay menor cantidad del RNAm del TRH R2.

Al tercer día este incremento se repite para el TRH R2, aunque sólo en la región anterior, y coincide, en tiempo y espacio, con un incremento significativo en los niveles de RNAm del TRH R1 y una disminución en los del proTRH, siempre comparado con el respectivo de control de nado. 30 minutos después (es decir a los 60 minutos post entrenamiento) estas diferencias desaparecen, como ocurre después del primer día.

En el hipocampo de las ratas entrenadas por cinco días, 30 minutos después del último ensayo, hay menor cantidad de RNAm de los dos receptores del TRH en la porción anterior (aunque la diferencia no es significativa para el TRH R2); éstas diferencias desaparecen 30 minutos después, que es cuando se presenta, en la zona posterior, mayor cantidad de los RNAm del proTRH y del TRH R1; el incremento del RNAm del proTRH aparece desde los 30 minutos post entrenamiento.

También al 5to día, en los animales entrenados, el incremento del RNAm del proTRH en el hipocampo posterior coincide con una disminución en los niveles del péptido maduro. Dado que los niveles del péptido reflejan cambios en los eventos de síntesis y liberación (Charli, et al., 1998), los datos pueden interpretarse como una activación de las neuronas TRHérgicas que induce la liberación del péptido y la síntesis del precursor a nivel transcripcional.

Concomitante con el posible aumento en la liberación del péptido ocurre un incremento en la síntesis del RNAm del receptor TRH R1. Hasta ahora la regulación de la expresión de los receptores de TRH se ha estudiado a detalle en líneas celulares (Hinkle y

Tashjian, 1975; Oron, et al, 1987) y no hay información directa de lo que ocurre en neuronas. En la mayoría de estos trabajos se ha reportado que, ante una estimulación con TRH, además de las vías de señalización que se desencadenan, hay una reducción en la cantidad de receptores en la membrana por internalización en vesículas cubiertas de clatrina (Ashworth, et al, 1995). Si la estimulación se deja proseguir se induce una disminución en los niveles del RNAm (Gershengorn y Osman, 1996; Yu y Hinkle, 1997). La disminución en la expresión de R1 y R2 podría interpretarse como una resultante del efecto del TRH liberado. Sin embargo, también se ha reportado que el RNAm del TRH R1 incrementa al estimular células con el péptido (Cook y Hinkle, 2004). En el caso del quinto día, a los 60 minutos, las alteraciones medidas también podrían implicar que las neuronas TRHérgicas, al liberar el péptido, afectan la síntesis del receptor en neuronas post-sinápticas. Varias vías neuronales con diferentes neurotransmisores se activan en los procesos de aprendizaje y memoria, por lo que es difícil definir cual es la responsable de los efectos observados en la cantidad de RNAm de los receptores (de Gortari, et al, 1995; sometido).

En el hipocampo posterior, los cambios en la síntesis de TRH del quinto día coinciden con cambios reportados (Gómez Pinilla, et al., 2001), también descritos para los sujetos de este estudio (Sánchez, et al, en preparación), en los RNAm del BDNF y de su receptor TrkB (“tropomyosin-related kinase B”), ambos con un papel conocido en los procesos de aprendizaje y memoria (Gómez Pinilla, et al., 2001). La expresión de BDNF y TrkB está modulada en el hipocampo por agonistas glutamatérgicos, crisis epilépticas, traumatismo cerebral, isquemia, antidepresivos y con ejercicio físico (Tapia-Arancibia, et al, 2004; Mu, et al, 1999). La inducción de LTP en hipocampo incrementa la expresión de BDNF y TrkB; la LTP no ocurre en ratones que carecen de BDNF (Tapia-Arancibia, et al, 2004; Mu, et al, 1999). El BDNF en el hipocampo, regula la síntesis de acetilcolina, glutamato, serotonina y GABA (Tapia-Arancibia, et al, 2004). Además, es necesario para la adquisición de tareas espaciales, pues la anulación de su actividad (por anticuerpos o en los ratones que carecen del gen del BDNF o de su receptor) produce una dramática deficiencia de la memoria espacial (Tapia-Arancibia, et al, 2004; Mu, et al, 1999). El estrés también regula la expresión del BDNF; la administración de altas dosis de CT o estrés disminuye su expresión, sin embargo, la adrenalectomía, y por tanto la ausencia de GC circulantes, tiene el mismo efecto, el cual puede ser revertido por la inyección de dexametasona (un análogo de la CT). Lo anterior sugiere que la curva dosis-respuesta tiene forma de “U” invertida

(Tapia-Arancibia, et al, 2004) es decir, niveles bajos son necesarios pero después de cierto umbral la CT tiene un efecto inhibitorio.

Los cambios al 5to día en la expresión de TRH, TRH R1 y BDNF (en el hipocampo posterior) concurren con el establecimiento de modificaciones estructurales en el hipocampo y de memorias a largo plazo (Ramírez-Amaya, et al, 2001), sugiriendo un papel para el TRH en este fenómeno. Acorde con esta suposición, en esta zona los RNAm del proTRH y el del TRH R1 correlacionan negativamente con la suma del tiempo, de forma tal que en las ratas con mejor desempeño en la tarea hay una mayor concentración de estos RNA mensajeros. La consolidación de la información espacial en memoria a largo plazo requiere fenómenos como la síntesis de proteínas. La inyección intra-cerebro-ventricular de anisomicina (un inhibidor de la síntesis de proteína) impide la adquisición de la tarea espacial del laberinto de Morris, sin afectar memoria a corto-plazo o memorias preexistentes (Cavallaro, et al, 1997; D'Hooge y De Deyn, 2001). Se ha sugerido que las proteínas sintetizadas *de novo* contribuyen a la aparición de modificaciones en la estructura, distribución y número de sinapsis que subyacen la representación a largo plazo de la información espacial. Se ha observado que la LTP induce sinaptogénesis en las fibras musgosas (las proyecciones de giro dentado hacia CA3) y al entrenar animales en el laberinto de Morris por 4 ó 5 días, también se observa la formación de nuevas sinapsis en el *stratum oriens* de CA3 (donde se encuentran las terminales nerviosas de las fibras musgosas que provienen del GD). Estos animales recuerdan mejor la localización de la plataforma 7 y 30 días después del último entrenamiento (Ramírez-Amaya, et al, 2001). Adicionalmente, la formación de nuevas sinapsis depende de la activación de los receptores glutamatérgicos tipo NMDA (Ramírez-Amaya, et al, 2001); *in vitro* se ha observado que el TRH puede incrementar los potenciales post-sinápticos excitatorios debidos a la activación de receptores tipo NMDA en neuronas piramidales de CA1 y en células granulares del giro dentado (Morimoto, et al, 1986; Stocca y Nistri, 1995); además el TRH facilita la LTP de la transmisión sináptica entre las fibras musgosas y CA3 (Ishihara, et al, 1991). Pareciera entonces que el aumento de la función TRHérgica en el hipocampo posterior, al 5to día, estuviera relacionado con la aparición de nuevas sinapsis.

También en el hipocampo posterior, el RNAm del TRH R2 correlaciona positivamente con la suma de las latencias, desde el primer hasta el quinto día; el RNAm de la PPII correlaciona de la misma forma con éste parámetro aunque sólo el primer y tercer

día. Además, estos dos RNAm correlacionan positivamente con la latencia del primer ensayo de los días 3 y 5.

En el caso de la PPII estas correlaciones implican un aumento en la función TRHérgica, ya que una disminución de la expresión de la PPII en las ratas con mejor aprendizaje (menor latencia), incrementaría, en principio, la vida media del TRH en el espacio extracelular. Aunque al primer día en las ratas entrenadas hay un incremento en la expresión de la enzima, indicando una posible disminución en la función TRHérgica, en este grupo ocurrió la correlación positiva con la suma de las latencias, revelando que en los días 1 y 3, las ratas con mejor desempeño tienen disminuido el mecanismo de eliminación extracelular del TRH. Se han reportado mejoras cognitivas, mayores a las producidas por el TRH mismo, al administrar análogos del péptido resistentes a la degradación (revisado por Horita, 1998) o un inhibidor de prolil endopeptidasas (Shinoda, et al, 1999); en ambos casos son tratamientos que incrementan la disponibilidad de TRH en el espacio extracelular. Se ha sugerido que las peptidasas tienen un papel muy importante en los mecanismos homeostáticos que controlan la función cerebral (Charli, et al, 1998), de hecho su regulación por la actividad eléctrica debe contribuir a los cambios a largo plazo en la transmisión de información (de Gortari, et al, sometido).

El caso del TRH R2 es más difícil de interpretar, pues su papel fisiológico en zonas específicas del sistema límbico es desconocido (al igual que el del TRH R1). Pareciera que en las ratas con mejor aprendizaje, ocurriera una disminución del RNAm del TRH R2, en contraposición al resto de la evidencia que parece indicar un incremento en la transmisión TRHérgica del hipocampo posterior (primero por disminución de la degradación y al final por un aumento en la síntesis y en la cantidad de receptor 1). Incluso, al quinto día, la aparente hipofunción de la señalización mediada por el TRH R2, coincide con un incremento en la de TRH R1 en una zona posterior del hipocampo. Éste tipo de regulación en sentidos opuestos de los receptores de TRH se ha observado durante el desarrollo del “kindling” en la corteza piriforme (insular) de la rata (De Gortari, et al, sometido); hasta el momento se desconoce el significado biológico de este fenómeno.

Si bien se desconoce si existe un papel diferencial de los receptores de TRH, su distribución mutuamente excluyente (en la mayor parte del SNC) (Heuer, et al, 2000) y el descubrimiento de cinéticas opuestas de regulación, así lo sugiere.

El RNAm del TRH-R2 es casi indetectable en el hipocampo (CA's y GD), a diferencia del TRH-R1. Sin embargo, durante el desarrollo del “*kindling*” (etapa II) hay un aumento dramático y transitorio en la expresión del TRH R2 y de la PPII, no así del TRH R1 (de Gortari, et al, sometido). Semejante a los cambios detectados en el “*kindling*” parcial, la co-regulación de la PPII y el TRH-R2 durante el primer día de entrenamiento sugiere la activación de neuronas post-sinápticas o al menos vías de señalización distintas a las que se activan al 5° día, cuando aumentan los niveles de RNAm del proTRH y el TRH R1.

En la zona anterior del hipocampo, al 3er día, se presenta menor cantidad del RNAm del proTRH (aunque hay un incremento de los receptores); al quinto día, el RNAm del R1 disminuye, se acumula el péptido procesado (probablemente por inhibición de la liberación, ya que no hay indicio de aumento en la síntesis, al menos a nivel transcripcional) y la cantidad de RNA mensajero (medida a los 30 minutos) de todos los elementos de la transmisión TRHérgica, correlacionó positivamente con la suma del tiempo de ese día (para el proTRH esta correlación ocurrió desde el primer día). Parecería que en las ratas con mejor desempeño en el aprendizaje, el sistema TRHérgico está inhibido en el hipocampo anterior, contrario a lo encontrado en el posterior y a los reportes de efectos beneficiosos del péptido en el aprendizaje (revisado por Horita, 1998). Sin embargo, la administración de TRH en el hipocampo anterior en una especie de ardilla (*Citellus lateralis*), desencadena funciones excitadoras sólo si el animal está dormido (reduce todos los estados del sueño y desincroniza la actividad eléctrica del cerebro si la ardilla está en sueño de ondas lentas) o despierto en estado inmóvil (incrementa la termogénesis y la actividad motora espontánea); si la administración se hace en un animal despierto y activo, produce efectos opuestos (Stanton, et al, 1981). Así mismo, el TRH puede disminuir el uso de glucosa en las neuronas del hipocampo (y otras zonas del sistema nervioso central) si se administra a un animal despierto y activo, y ocurre lo contrario si el animal está narcotizado (Nagai, et al, 1980). Esto podría implicar que, en el hipocampo anterior, el TRH participa en la regulación del estado de alerta del animal, actuando de acuerdo a la demanda de atención requerida, es decir, una hipofunción TRHérgica ocurriría en situaciones en las que el animal se encuentra activo.

Las correlaciones de la expresión de los RNAm con parámetros de aprendizaje, así como las distintas cinéticas seguidas por cada uno de los RNAm en la zona anterior versus

la posterior, sugieren distintas funciones a lo largo de eje septo-temporal para el TRH. Al tratar de determinar por hibridación *in situ* la localización precisa de los cambios observados en el RNAm del TRH R1, observamos que éste aumenta con mayor intensidad en la sección dorsal de lo que nosotros hemos denominado hipocampo posterior. La región ventral también presenta algunos cambios en el mismo sentido, aunque estos no son tan marcados ni tan consistentes a lo largo de la zona analizada.

Otro aspecto que resaltó en el análisis *in situ* es que los cambios en el TRH R1 parecen estar restringidos al hemisferio izquierdo del cerebro. Lateralización en las funciones de memoria espacial había sido reportada en humanos y en ratas de edad avanzada (Burgess, 2002; Moskal, et al, 2004). En taxistas londinenses, al momento de recordar una ruta, se observa un incremento en la actividad metabólica en la región temporal del hemisferio izquierdo (Burgess, 2002). En ratas de edad avanzada se ha observado que la reducción en la capacidad para resolver tareas espaciales correlaciona con daños en la formación hipocampal del hemisferio izquierdo y no la del derecho (Moskal, et al, 2004). Un análisis global de la expresión de genes por medio de microarreglos, mostró que a lo largo del desarrollo hay expresión diferencial de genes entre ambos hemisferios del hipocampo (Moskal, et al, 2004). No es extraño entonces el descubrimiento de que la respuesta del RNAm del TRH R1 sea distinta entre los hemisferios cerebrales.

G. FUNCIONES DISTRIBUIDAS EN EL EJE SEPTO-TEMPORAL DEL HIPOCAMPO

Es importante señalar que en pocos trabajos hacen una distinción entre la zona anterior y la posterior del hipocampo (eje septo-temporal) en relación a la regulación de la expresión de mensajeros químicos, por lo que es difícil en este momento explicar por qué las distintas cinéticas de respuesta en cada zona. Se ha reportado la expresión diferencial de genes entre las zonas septal-dorsal y la ventral-temporal del hipocampo en animales intactos (Leonardo, et al, 2004), como ocurre con los RNAm del proTRH y de TRH R1 (el primero más abundante en la porción septal-dorsal y el segundo en la temporal-ventral) (Heuer, et al, 2000).

Moser, et al (1993) proponen que distintas secciones de la formación hipocampal, a lo largo del eje septo – temporal, son relevantes para distintas funciones. Por ejemplo, la zona ventral (temporal), que tiene mayor relación anatómica con la amígdala y con el

hipotálamo, parece ser irrelevante en los procesos de aprendizaje y memoria espacial, sin embargo resulta importante para controlar la manifestación de conductas relacionadas a situaciones de ansiedad o estrés moderado, ya que las lesiones en esta región tienen un efecto ansiolítico, sin que se afecte considerablemente la actividad locomotora (Bannerman, et al, 2003). La región dorsal del hipocampo pareciera estar específicamente implicada en la adquisición de memorias de tipo espacial (Moser, et al, 1993). El proceso de sinaptogénesis asociado a la formación de memoria a largo plazo también parece seguir gradiente septo-temporal en el hipocampo, siendo mayor en la zona dorsal septal (Ramírez-Amaya, et al, 2001).

En contraste de Hoz, et al (2003) reportan que la pérdida de la capacidad de aprendizaje espacial por daños en la zona septal del hipocampo, sólo es evidente con ciertos protocolos de entrenamiento. Es posible entrenar ratas, a las que se ha dañado el hipocampo anterior y dejado sólo 20-40% del hipocampo de la zona temporal, en la tarea espacial del laberinto de Morris con protocolos menos intensivos (con menor número de ensayos en igual número de días), lográndose desempeños comparables a los de animales con la región septal intacta. Sugieren entonces que, si bien las conexiones extrínsecas del hipocampo presentan gradientes septo-temporales, en las intrínsecas no está tan marcada la distribución diferencial y por tanto, el procesamiento de la información podría ser una función distribuida en todo el eje longitudinal del hipocampo (de Hoz, et al, 2003).

Este y otros trabajos sugieren que la porción temporal del hipocampo también participa en el aprendizaje espacial. Sin embargo, el hecho de que las conexiones intrínsecas y extrínsecas del hipocampo sigan, en mayor o menor medida, gradientes septo-temporales, puede tener consecuencias funcionales que expliquen la diferencia en protocolos de entrenamiento requeridos para que la rata aprenda la tarea espacial cuando sólo tiene la parte septal o la temporal del hipocampo (de Hoz, et al, 2003). Queda claro sin embargo, que la porción temporal del hipocampo tiene un papel importante en la regulación de la respuesta al estrés, dadas sus conexiones con la amígdala y el hipotálamo (Bannerman, et al, 2003).

En resumen, los resultados de este trabajo permiten postular al TRH como participe en alguna de las funciones relacionadas con el aprendizaje. Además, la identificación de zonas responsivas permite abordar la siguiente etapa del trabajo, la administración local de TRH o de moléculas que impidan la expresión del péptido o sus receptores (siRNA) para anular la transmisión TRHérgica y definir más específicamente la relevancia fisiológica de los cambios encontrados en los procesos de aprendizaje y memoria.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abel T. y K.M. Lattal. (2001) Molecular mechanisms of memory acquisition, consolidation and retrieval. *Curr Op Neurobiol* 11: 180-7.
- Amaral D.G. y M.P. Witter. (1995) Hippocampal Formation. En: Paxinos, G. (Editor). *The Rat Nervous System*. 2a. edición. Academic Press. EUA. Pags. 443-3.
- Ashworth R., Yu R., Nelson E.J., Dermer S., Gershengorn M.C. y P.M. Hinkle. (1995) Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:512-6.
- Bannerman D.M., Grubb M., Deacon R.M.J., Yee B.K., Feldon J. y J.N.P. Rawlins. (2003) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res* 139: 197-213.
- Ballard T.M., Hunter A.J. y G.W. Bennett. (1996) Effect of a thyrotrophin-releasing hormone analogue, RX77368, on AMPA-induced septal-hippocampal lesioned rats in an operant delayed non-matching to position test. *Psychopharmacology (Berl)* 127: 265-75.
- Barbieri M. y A. Nistri. (1997) Effects of the neuropeptide thyrotropin-releasing hormone on GABAergic synaptic transmission of CA1 neurons of the rat hippocampal slice during hypoxia. *Peptides* 18: 585-591.
- Bauer K., Schomburg L., Heuer H. y M. K. H. Schäfer. (1999) Thyrotropin releasing hormone (TRH), the TRH-receptor and the TRH-degrading ectoenzyme; three elements of a peptidergic signalling system. *Results Probl Cell Differ* 26: 13-42.
- Bennett G.W., Ballard T.M., Watson C.D. y K.C. Fone. (1997) Effect of neuropeptides on cognitive function. *Exp Gerontol* 32: 451-69.
- Burgess N. (2002) The hippocampus, space, and viewpoints in episodic memory. *Q J Exp Psychol* 55: 1057-80.
- Cao J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lembo P., Ahmad S. y P. Walker. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 273: 32281-7.

- Cavallaro S., Meiri N., Yi C.L., Musco S., Ma W., Goldberg J. y D.L. Alkon (1997) Late memory-related genes in the hippocampus revealed by RNA fingerprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9669-73.
- Charli J.L., Vargas M.A., Cisneros M., de Gortari P., Baeza M.A., Jasso P., Bourdais J., Perez L., Uribe R.M. y P. Joseph-Bravo. (1998) TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology (Bp)* 6: 45-57.
- Chomczynski P. y N. Sacchi. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
- Crawley J.N. (2000) What's wrong with my mouse? Wiley-Liss. EUA. Pags. 83-130.
- Crews F.T., Morrow L., Criswell H. y G. Breese. (1996) Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39: 283-367.
- Cone D.R., Low M.J., Elmquist J.K. y J.L. Cameron. (2003) Neuroendocrinology. En: Larsen P.R., Kronenberg H.M., Melmed S. y K.S. Polonsky (Editores) Williams Textbook of Endocrinology. 10a edición. Saunders. EUA. Pags. 81-176.
- Cook L.B. y P.M. Hinkle. (2004) Agonist-dependent up-regulation of thyrotrophin-releasing hormone receptor protein. *Endocrinol* 145: 3095-100.
- Cook L.B., Zhu C.C. y P.M. Hinkle. (2003) Thyrotrophin-releasing hormone receptor processing: role of ubiquitination and proteasomal degradation. *Mol Endocrinol* 17: 1777-91.
- Cote-Vélez A., Pérez-Martínez L., Díaz-Gallardo M.Y., Pérez-Monter C., Carreón A., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (2005) Dexamethasone repressed cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: Identification of a composite GRE and a CRE in TRH promoter. *J Mol Endocrinol* 34: 177-97.
- Cotman C.W. y N.C. Berchtold. (2002) Exercise: a behavioral intervention to enhance brain health and plasticity. *Trends Neurosci* 25: 295-301.
- Danielson P.E., Forss-Petter S., Brow M.A., Callaveta L., Douglas J., Milner R.J. y J.G. Sutcliffe (1988) p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 7: 261-7.

- De Gortari P., Fernández-Guardiola A., Martínez A., Cisneros M. y P. Joseph-Bravo (1995) Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res* 679: 144-50.
- De Gortari P., Joseph-Bravo P., Monroy-Ruiz J., Martínez A., Cisneros M. y A. Fernández-Guardiola. (1998) Brain thyrotropin-releasing hormone content varies through amygdaloid kindling development according to afterdischarge frequency and propagation. *Epilepsia* 39: 897-903.
- De Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérez-Martínez L. y P. Joseph Bravo (2000) Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem Intern* 37: 483-496.
- De Gortari P., Romero F., Cisneros M. y P. Joseph-Bravo. (2005) Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochem Int* En prensa.
- De Gortari P., Uribe R.M., García-Vázquez A., Aguilar-Valles A., Martínez A., Valdés A., Chávez-Gutiérrez L., Jasso P., Boileau G., Charli J.L., Fernández-Guardiola A. y P. Joseph-Bravo. Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem Int* Sometido.
- D'Hooge R. y P.P. De Deyn. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 36: 60-90.
- De Wied D. (1997) Neuropeptides in learning and memory processes. *Behav Brain Res* 83: 83-90.
- French T.A., Masserano J.M. y N. Weiner. (1993) Influence of thyrotropin-releasing hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 99-106.
- Gershengorn M.C. y R. Osman. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev* 76: 175-91.
- Girard I. y T. Garland. (2002) Plasma corticosterone response to acute and chronic voluntary exercise in female house mice. *J Appl Physiol* 92: 1553-61.
- Gómez Pinilla F., So V. y J.P. Kesslak. (2001) Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res* 904: 13-9.

- Goshen-Gottsein Y. (2001) Learning and memory. *Encyclopedia of life sciences*. Nature Publishing Group. www.els.net
- Herman, J.P. y R. Spencer (1998) Regulation of hippocampal glucocorticoid receptor gene transcription and protein expression in vivo. *J Neurosci* 18: 7462-73.
- Heuer H., Schafer M.K., O'Donnell D., Walker P. y K. Bauer. (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* 428: 319-36.
- Hinkle P.M. y A.H. Tashjian Jr. (1975) Thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH3 strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 14: 3845-51.
- Hökfelt T., Tsuruo Y., Ulfhake B., Cullheim C., Arvidsson U., Foster G.A., Schultzberg M., Schalling M., Arborelius L., Freedman J., Post C. y T. Visser. (1989) Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. *Ann NY Acad Sci* 553: 76-105.
- Horita A. (1998) An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci* 62: 1443-8.
- Ikonen S. (2001) The role of the septohippocampal cholinergic system in cognitive functions. Disertación Doctoral. Universidad de Kuopio.
- Ishihara K., Katsuki H., Kawabata A., Sasa M., Satoh M. y S. Takaori. (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 Res* 554: 203-8.
- Ishizuka N., Weber J. y D.G. Amaral (1990) Organization of intrahippocampal projections originating from CA3 pyramidal cells in the rat. *J Comp Neurol* 295: 580-623.
- Jaworska-Feil L., Turchan J., Przewlocka B., Budziszewska B., Leskiewicz M. y W. Lason. (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 J.L., Palacios J.M. y C. Córdón. (1979) Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinol* 104: 801-6.
- Joseph-Bravo P., Uribe R.M., Vargas M.A., Pérez-Martínez L., Zoeller T. y J.L. Charli. (1998) Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cel Mol Neurobiol* 18: 231-47.
- Kandel E.R., Schwartz J.M. y T.M. Jessell (Editores). (1995) Essentials of Neural Science and Behavior. Appleton and Lange. EUA. Pags. 651-94.
- Karandrea D., Kittas C. y E. Kitraki. (2002) Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology* 75: 217-26.
- Kasparov S.A. y B.A. Chizh. (1992) The NMDA-receptor antagonist dizocilpine (MK-801) suppresses the memory facilitatory action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuropeptides* 23: 87-92.
- Khan A., Lai H., Ukai Y. y M.H. Mirolo. (1994) NS-3, a TRH analog, reverses repeated ECS-induced deficits in water maze performance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 47: 477-81.
- Kim J.J. y M.G. Baxter. (2001) Multiple brain-memory systems: the whole does not equal the sum of its parts. *Trends Neurosci* 24: 234-30.
- Knoblach S.M. y M.J. Kubek. (1997) 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.
- Koenig M.L., Yourick D.L. y J.L. Meyerhoff. (1996) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) attenuates glutamate-stimulated increases in calcium in primary neuronal cultures. *Brain Res* 730: 143-149.
- Kopp J., Nanobashvili A., Kikaia Z., Lindvall O. y T. Hökfelt. (1999) Differential regulation of mRNAs for neuropeptide Y and its receptor subtypes in widespread areas of the rat limbic system during kindling epileptogenesis. *Mol Brain Res* 72: 17-29.
- Kubek M.J., Knoblach S.M., Shariff N.A., Burt D.R., Buterbaugh G.G. y K. Fuson. (1993) Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann Neurol* 33: 70-6.

- Lechan R.M., Wu P. e I.M. Jackson. (1986) Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 119: 1210-6.
- Lechan R. M., y R. Toni. (1992) Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. En: Nemeroff C.B. (Editor) *Neuroendocrinology*. CRC Press, E.U.A. Pags. 279-330.
- Lee S.L., Stewart K. y R.H. Goodman. (1988) Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* 263: 16604-9.
- Leonardo E.D., Richardson-Jones J.W., Sibille E. y R. Hen. (2004) Molecular heterogeneity along the dorsal/ventral axis of the hippocampal CA1 region: A DNA microarray screen. Program No. 552.1. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- Liu D., Diorio J., Day J.C., Francis D.D. y M.J. Meaney. (2000) Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci* 3. 799-806.
- Manaker S., Winokur A., Rostene W.H. y T.C. Rainbow. (1985) Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *J Neurosci* 5: 167-74.
- Mantyh P.W. y S.P. Hunt. (1985) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors. Localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H][3-Me-His2]TRH as the radioligand. *J Neurosci* 5: 551-61.
- Méndez M., Joseph-Bravo P., Cisneros M., Vargas M.A. y J. L. Charli. (1987) Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8: 291-8.
- Miesfeld R., Rusconi S., Godowski P.J., Maler B.A., Okret S., Wikstrom A.C., Gustafsson J.A. y K.R. Yamamoto. (1986) Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* 46: 389-99.

- Miyamoto M., Hirai K., Heya T. y A. Nagaoka. (1994) Effects of a sustained release formulation of thyrotropin-releasing hormone on behavioral abnormalities in senescence-accelerated mice. *Eur J Pharmacol* 271: 357-66.
- Miyamoto M., Hirai K., Takahashi H., Kato K., Nishiyama M., Okada H. y A. Nagaoka. (1993) Effects of sustained release formulation of thyrotropin-releasing hormone on learning impairments caused by scopolamine and AF64A in rodents. *Eur J Pharmacol* 238: 181-9.
- Morimoto K., Goddard G.V. y N.E. Sirett. (1986) Effects of a new thyrotropin-releasing hormone analogue (DN-1417) on evoked responses and long-term potentiation in the dentate gyrus of rat. *Neurosci Lett* 63: 195-9.
- Morris R.G., Moser E.L., Riedel G., .Martin S.J., Sandin J., Day M. y C. O'Carroll. (2003) Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358: 773-86.
- Morzorati S. y M.J. Kubek. (1993) The effect of TRH on ethanol-induced sedation in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Neuropeptides* 25: 283-7.
- Moser E., Moser M.B. y P. Andersen. (1993) Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 13: 3916-25.
- Moskal J.R., Kroes R.A., Otto N.J., Rahimi O., Cantu R.E. y B.J. Claiborne. (2004) Distinct patterns of gene expression between right and left hippocampi in neonatal rats. Program No. 616.9. Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.
- Mu J.S., Li W.P., Yao Z.B. y X.F. Zhou. (1999) Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats. *Brain Res* 835: 259-65.
- Muller Y.L., Reitstetter R. y A.J. Yool. (1998) Regulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channel expression in rat cerebellum during postnatal development. *J Neurosci* 18:16-25.

- Myhrer T. (2003) Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev* 41: 268-87.
- Nagai Y., Narumi S., Nagawa Y., Sakurada O., Ueno H. y S. Ishii. (1980) Effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on local cerebral glucose utilization, by the autoradiographic 2-deoxy[14C]glucose method, in conscious and pentobarbitalized rats. *J Neurochem* 35: 963-71.
- Nakazawa K., McHugh T.J., Wilson M.A. y S. Tonegawa. (2004) NMDA receptors, place cells and hippocampal spatial memory. *Nature Rev Neurosci* 5: 361-74.
- Odell W.D. y W.H. Daughaday (Editores). (1971) Principles of competitive protein-binding assays. J.B. Lippincott Company. EUA. 419 pp.
- O'Dowd B.F., Lee D.K., Huang W., Nguyen T., Cheng R., Liu Y., Wang B., Gershengorn M.C. y S.R. George. (2000) TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol Endocrinol* 14: 183-93.
- Ogasawara T., Itoh Y., Tamura M., Ukai Y., Yoshikuni Y. y K. Kimura. (1996) NS-3, a TRH-analog, reverses memory disruption by stimulating cholinergic and noradrenergic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 391-9.
- Ogasawara T., Nakagawa Y., Ukai Y., Tamura M. y K. Kimura. (1995a) NS-3(CG3703), a TRH analog, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 929-34.
- Ogasawara T., Ukai Y., Tamura M. y K. Kimura. (1995b) NS-3 (CG3703), an analog of thyrotropin-releasing hormone, ameliorates cognitive impairment in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 50: 499-503.
- O'Keefe J. y J. Dostrovsky. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34: 171-5.
- Oron Y., Straub R.E., Traktman P. y M.C. Gershengorn. (1987) Decreased TRH receptor mRNA activity precedes homologous downregulation: assay in oocytes. *Science* 238: 1406-8.
- Palkovits M. y M. Brownstein. (1988) Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain. Elsevier, EUA.

- Panocka I., Coppi G., Maggioni A., Olgiati V., Sabbatini M. y F. Amenta. (1997) Effect of the thyrotropin releasing hormone analogue posatirelin (RGH 2202) on microanatomical changes induced by lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Drugs Exp Clin Res* 23: 3-23.
- Paulsen O. y E.I. Moser. (1998) A model of hippocampal memory encoding and retrieval: GABAergic control of synaptic plasticity. *TINS* 21: 273-8.
- Pérez-Martínez L., Carreón-Rodríguez A., González-Alzati M.E., Morales C., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1998) Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68: 345-54.
- Pizzi M., Boroni F., Benarese M., Moraitis C., Memo M. y P. Spano. (1999) Neuroprotective effect of thyrotropin-releasing hormone against excitatory amino acid-induced cell death in hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 330: 133-137.
- Ramírez-Amaya V., Balderas I., Sandoval J., Escobar M.L. y F. Bermúdez-Rattoni. (2001) Spatial long-term memory is related to mossy fiber synaptogenesis. *J Neurosci* 21: 7340-8.
- Ramírez-Amaya V., Escobar M.L., Chao V. y F. Bermúdez-Rattoni. (1999) Synaptogenesis of mossy fibers induced by spatial water maze overtraining. *Hippocampus* 9: 631-6.
- Renaud L.P., Blume H.W., Pittman Q.J., Lamour Y. y A.T. Tan. (1979) Thyrotropin-releasing hormone selectively depresses glutamate excitation of cerebral cortical neurons. *Science* 205: 1275-6.
- Roozendaal B. (2003) Systems mediating acute glucocorticoid effects on memory consolidation and retrieval. *Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psych* 27:1213-23.
- Save E. y B. Poucet (2005) Piloting. En: Wishaw I.Q. y B. Kolb (Editores). The Behavior of the Laboratory Rat: a Handbook with Tests. Oxford University Press. EUA. Pags. 392-400.
- Schally A.V., Redding T.W., Bowers C.Y. y J.F. Barrett. (1969) Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 244: 4077-88.

- Schauder B., Schomburg L., Köhrle J. y K. Bauer. (1994) Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9534-8.
- Sharif N.A. y D.R. Burt. (1985) Limbic, hypothalamic, cortical and spinal regions are enriched in receptors for thyrotropin-releasing hormone: evidence from [3H]ultrathin autoradiography and correlation with central effects of the tripeptide in rat brain. *Neurosci Lett* 60: 337-42.
- Shinoda M., Miyazaki A. y K. Toide. (1999) Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and on cholinergic and peptidergic neurons with ibotenate-induced lesions of the nucleus basalis magnocellularis. *Behav Brain Res* 99:17-25.
- Shishido Y., Furushiro M., Tanabe S., Shibata S., Hashimoto S. y T. Yokokura. (1999) Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur J Pharmacol* 372: 135-142.
- Smith M.A., Makino S., Kvetnansky R. Y R.M. Post. (1995) Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15: 1768-77.
- Smythe J.W., Murphy D., Timothy C. y B. Costall. (1997) Hippocampal mineralocorticoid, but not glucocorticoid, receptors modulate anxiety-like behavior in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 56: 507-13.
- Squire L.R., Bloom F.E., McConnell S.K., Roberts J.L., Spitzer N.C. y M.J. Zigmond (2003) Fundamental Neuroscience. Academic Press, E.U.A. 1426 pp.
- Stanton T.L., Bechman A.L. y A. Winokur. (1981) Thyrotropin-releasing hormone effects in the central nervous system: dependence on arousal state. *Science* 214: 678-81.
- Stocca G. y A. Nistri. (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. y A. Nistri. (1996) The neuropeptide thyrotropin-releasing hormone modulates GABAergic synaptic transmission on pyramidal neurones of the rat hippocampal slice. *Peptides* 17: 1197-1202.

- Suzuki W.A. y N. S. Clayton. (2000) The hippocampus and memory: a comparative and ethological perspective. *Curr Op Neurobiol* 10: 768-73.
- Sweatt, J.D. (2003) Mechanisms of memory. Elsevier Academic Press.EUA. 400 pp.
- Tapia-Arancibia L., Rage F., Givalois L. y S. Arancibia. (2004) Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 25: 77-107.
- Thompson B.L. y J.B. Rosen. (2000) Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides* 34: 38-44.
- Toide K., Shinoda M., Takase M., Iwata K. y H. Yoshida. (1993) Effects of a novel thyrotropin-releasing hormone analogue, JTP-2942, on extracellular acetylcholine and choline levels in the rat frontal cortex and hippocampus. *Eur J Pharmacol* 233: 21-8.
- Tsien J.Z., Huerta P.T. y S. Tonegawa. (1996) The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-38.
- Uribe R.M., Pérez-Martínez L., Covarrubias M.L., Gómez O.B., Covarrubias L., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1995) Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neurosci Letters* 201: 41-4.
- Uribe R.M., Redondo J.L., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1993) Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58: 140-145.
- Valentijn K., Vandenbulcke F., Piek E., Beauvillain J.C. y H. Vaudry. (1998) Distribution, cellular localization, and ontogeny of preprothyrotropin-releasing hormone-(160-169) (Ps4)-binding sites in the rat pituitary. *Endocrinology* 139: 1306-1313.
- Vargas M.A., Méndez M., Cisneros, M., Joseph-Bravo P. y J.L. Charli. (1987) Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neurosci Lett* 79: 1476-92.

- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., ZIF M. y M.J. Meaney. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* 7: 847-54.
- White N.M. y R.J. McDonald. (2002) Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. *Neurobiol Learn Mem* 77: 125-84.
- Wilson M.A. y B.L. McNaughton. (1993) Dynamics of the hippocampal ensemble code for space. *Science* 261: 160-3.
- Yamamura M., Kinoshita K., Nakagawa H. y R. Ishida. (1991) Pharmacological study of TA-0910, a new thyrotropin-releasing hormone (TRH) analog (IV): Effects on experimental memory impairment in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 55: 241-53.
- Yu R., y P.M. Hinkle (1997) Desensitization of thyrotropin-releasing hormone receptor-mediated responses involves multiple steps. *J Biol Chem* 272: 28301-7.
- Zhao D., Yang J., Jones K.E., Gerald C., Suzuki Y., Hogan P.G., Chin W.W. y A.H. Jr Tashjian. (1992) Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. *Endocrinol* 130:3529-36.
- Zervas I.M., Pehlivanidis A.A., Papakostas Y.G., Markianos M., Papadimitriou G.N. y C.N. Stefanis. (1998) Effects of TRH administration on orientation time and recall after ECT. *J ECT* 14: 236-40.