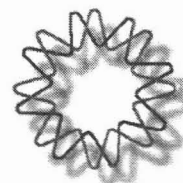




00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS, INSTITUTO DE
BIOTECNOLOGÍA.

**Participación de la Hormona Liberadora de Tirotropina
en la Conducta de Ansiedad.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
PRESENTA

Mariana Gutiérrez Mariscal

Asesora: Dra. Patricia de Gortari Gallardo

2005

m342287



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Para la más valiente, Daniela Martínez Mariscal.

Este trabajo se realizó en el Instituto de Biotecnología, departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, laboratorio de Neurobiología Celular y Molecular con el apoyo económico del proyecto IN 222603 de la DGAPA de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Patricia de Gortari Gallardo. Durante los cursos de Maestría se contó con las becas de posgrado del CONACyT y de la DGEP

Agradecimientos

A la Dra. Patricia Joseph Bravo quien me ha apoyado durante todo este tiempo y de quien día a día aprendo más, no sólo a nivel profesional sino también personal.

A la Dra. Patricia de Gortari Gallardo, por la paciencia y confianza que me ha tenido y sobretodo por su apoyo constante.

A la Dra. Carolina López Rubalcava, por sus invaluable aportaciones en las cuestiones conductuales de este proyecto, desde la realización de los estos experimentos de enterramiento, hasta las discusiones de cada tutorial.

A los sinodales que leyeron este trabajo y que aún bajo la presión del tiempo, lo hicieron a detalle: Dra. Georgina Ponce Romero, Dr. Ignacio Camacho Arroyo, al Dr. Enrique Reynaud Garza y doble agradecimiento a la Dra. Erika Estrada Camarena, pues además de revisar cuidadosamente el escrito, nos ayudó a realizar el experimento de inyección de TRH.

Al personal de la Unidad de Docencia del IBT: Ing. Jalil Saab, Gloria Villa y Maribel Velasco por su ayuda en hacer más fáciles los trámites administrativos.

A todos mis compañeros del Laboratorio del IBT: Argel, Arlene, Edna, Carlos, Lucía, Ray, Edith, Alfonso, Vicenta, Loraine, Daniela y Miriam por compartir, espacio, recursos, conocimiento, por hacer un ambiente ameno y acogedor. A los Dres. Leonor, Miguel Angel y Marta. En especial agradezco al Dr. Jean Louis Charli por su criterio crítico que invita al razonamiento. Por el apoyo técnico constante agradezco a: Dra. Antonieta Cote, Q.I. Fidelia Romero, Q.F.B. Miguel Cisneros, Miguel Angel Olvera y a Manuel Villa. Agradezco a la unidad de síntesis del IBT, Dr. Paul Gaytan y al M. en C. Eugenio López.

También agradezco al personal del laboratorio de Farmacobiología del CINVESTAV Sede-Sur, en particular a la T. María Isabel Beltrán Villalobos y al T. Julian Oikawa Sala por colaborar en el cuidado de los animales utilizados en este proyecto y en la realización de los experimentos de ansiedad.

Del Instituto Nacional de Psiquiatría, agradezco al Biol. Adrián Martínez Cervantes por la canulación de las ratas utilizadas en el experimento de inyección de TRH, a Edith López Ruiz, German Vega Flores y al T. Bernardo Contreras Cisneros por su apoyo durante dicho experimento así como al veterinario del bioterio.

A nivel personal, agradezco a toda mi familia por las lecciones de amor, fuerza, lucha y solidaridad que siempre me han dado pero que en estos últimos meses han sido aún más evidentes. A todos, los quiero mucho!

A mis tíos Miguel y Rosi y a mis primos Miguel y Daniela, me gustaría reconocerles lo fuertes que han sido, me han enseñado más de lo que se pueda estudiar en cualquier universidad y lo bueno es que ahora sólo nos queda ir para arriba y seguir adelante todos juntos.

A mis papás y a mi hermana, nunca les podré agradecer suficiente por siempre estar ahí para mí, les debo todo lo que soy y no me canso de decirles que los quiero y los admiro.

A mis suegros María Rosa y Tomás y por ser tan lindos conmigo y por haber hecho un hijo tan bonito, a mi cuñis Adriana.

A los grandes y ya añejos amigos: Victor, Rolando, Rebeca, Mary, a Lakshmi, a las españolas (Gabi, Lila, Marina y Miriam) y a sus familias, chicas siempre las llevo conmigo. A los que hacen la vida en cuerna divertida: a la bella pareja dispareja, Andrés y Ana; a los recién re-llegados muppets, Luis y Ángeles y sus desayunos en familia; a la nueva familia de los pollos, Victor y Brenda; a las tías Viviana y Elia; a Gufo, a Yoc. A mis amigos de la maestría, Margara , Rocío, Aleph, Javier, Álvaro y Ulises.

A Alejandro, porque contigo soy feliz, te quiero.

INDICE

I. RESUMEN 1

II. ANTECEDENTES 2-23

1. HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA, TRH.

1.1 Biosíntesis y Procesamiento (2)

1.2 Localización en el Sistema Nervioso Central(4)

1.3 Receptores y localización (5)

1.4 Piroglutamil peptidasa II (7)

2. FUNCIONES NEUROENDÓCRINAS

2.1Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo (8)

2.2 El estrés y el Eje Hipotálamo-Hipófisis -Adrenal (10)

3. TRH EXTRAHIPOTALÁMICO (12)

4. FUNCIONES DEL SISTEMA LÍMBICO

4.1 Las emociones son el resultado de procesos neurales (13)

4.2 Ansiedad (15)

4.3 Sustratos anatómicos de la ansiedad (16)

5. MODELOS ANIMALES DE ANSIEDAD (19)

5.1 Modelo de Ansiedad de Enterramiento Defensivo (21)

6. TRH Y MODELOS ANIMALES DE PATOLOGÍAS HUMANAS (22)

III. HIPÓTESIS

1. HIPÓTESIS GENERAL (24)

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO (24)

IV. OBJETIVOS 26

V. MATERIALES Y MÉTODOS 27-40

1. ANIMALES Y MODELO EXPERIMENTAL

1.1 Animales (27)

1.2 Prueba de Enterramiento Defensivo (27)

2. PARADIGMA A

2.1 Grupos (29)

3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.1 Preparación de muestras (29)

3.2 Extracción de TRH (30)

3.3 Radioinmunoensayo de TRH (30)

3.4 Radioinmunoensayo de TSH (31)

3.5 Radioinmunoensayo de Corticosterona (33)

3.6 Extracción de RNA total (34)

3.7 Procedimiento de RT-PCR (35)

3.8 Análisis semi-cuantitativo de RNAm (38)

4. PARADIGMA B

4.1 Experimento de inyección de TRH (38)

4.2 Cirugía (39)

4.3 Grupos (39)

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS (40)

VI. RESULTADOS 41-58

1. EXPERIMENTO PRELIMINAR (41)

2. PARÁMETROS CONDUCTUALES: PARADIGMA A (41)

3. CONTENIDO DE CORTICOSTERONA EN SUERO CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO (43)

4. SEMICUANTIFICACIÓN DEL RNAm DE PRO-CRH Y DE GR EN EL HIPOTÁLAMO DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO (43)

5. TSH SÉRICA, CONTENIDO DE TRH, SEMICUANTIFICACIÓN DEL RNAm DE PRO-TRH, TRH-R1 Y TRH-R2 EN EL HIPOTÁLAMO DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO (47)

6. CONTENIDO DE TRH EN OTRAS REGIONES DEL SISTEMA LÍMBICO

6.1 Hipocampo, Núcleo Accumbens y Septum (50)

6.2 Corteza Frontal (50)

7. SEMICUANTIFICACIÓN DEL RNAM DE PRO-CRH Y DE GR EN EL AMÍGDALA DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO (52)

8. CONTENIDO DE TRH, SEMICUANTIFICACIÓN DEL RNAM DE PRO-TRH, TRH-R1 Y TRH-R2 EN EL AMÍGDALA DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO (53)

9. PARÁMETROS CONDUCTUALES: PARADIGMA B (54)

10. TSH SÉRICA EN EL PARADIGMA B (56)

VII. DISCUSIÓN 59-66

1. CONDUCTA Y EJE HHA (59)

2. EJE HHT Y LA VÍA TRHÉRGICA HIPOTÁLAMICA (60)

3. EL CRH EN LA AMÍGDALA (62)

4. EL TRH EN LA AMÍGDALA (63)

5. TRH EN CORTEZA FRONTAL, HIPOCAMPO Y NÚCLEO ACCUMBENS

5.1 Núcleo Accumbens, Hipocampo y Septum (64)

5.2 Corteza frontal (65)

6. EFECTOS DE LA INYECCIÓN I.C.V. DE TRH EN LA CONDUCTA DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO (65)

VIII. CONCLUSIONES 67

IX. REFERENCIAS 68-75

I. RESUMEN

Se analizó la participación del TRH en el modelo de ansiedad de Enterramiento Defensivo (ED) en regiones del sistema límbico de la rata. Se utilizaron ratas macho adultas de las cepas Wistar (W) y Wistar Kyoto (WKY) pues difieren en la sensibilidad a eventos estresantes y en sus respuestas conductuales y neuroendócrinas ante éstos. Se cuantificó el contenido de TRH en: Hipotálamo (Hip), Núcleo Accumbens (NAcc), Corteza Frontal (CxF), Amígdala (Am), Hipocampo (Hc) y Septum (S); Se analizó semi-cuantitativamente el RNAm de proTRH en Hip, NAcc, Am e Hc; el de los receptores a TRH (TRH-R1 y TRH-R2), de pro-CRH y del receptor a glucocorticoides GR en Am e Hip. Se cuantificó corticosterona y tirotropina séricas como indicadores de la activación de los ejes Adrenal y Tiroideo, respectivamente. Cuantificamos y comparamos las respuestas conductuales al modelo de ansiedad de las dos cepas: la cepa WKY fue más sensible al estímulo aversivo del paradigma de ansiedad pues necesitó menos cantidad de choques eléctricos para desplegar la conducta defensiva y la cepa W mostró mayor actividad durante la prueba conductual pues empleó más tiempo enterrando el electrodo, además reportamos que la cepa WKY se aproximó menos veces al electrodo lo que denota mayor miedo ante la fuente aversiva. Nuestros resultados indicaron que en respuesta al modelo de ED: 1) en el hipotálamo de la cepa W: el RNAm de pro-TRH aumentó, el contenido de TRH disminuyó pero esto no causó aumento en la tirotropina sérica mientras que en esta misma región, la cepa WKY presentó aumento en el RNAm de pro-TRH, en contenido de TRH, en la Tirotropina circulante (a los 60 min) y en el RNAm del TRH-R1. 3) El RNAm de pro-TRH en Am disminuyó y el contenido de péptido aumentó en ambas cepas además, se observó una regulación positiva del RNAm del TRH-R2, aunque sólo en la cepa W. 4) Solo en la cepa WKY el contenido de TRH en CxF cambió debido al modelo de ansiedad. 5) El contenido de TRH en el Hc aumentó en grupos manipulados y experimentales mientras que en S y en NAcc el contenido de TRH no cambió. 6) La inyección central (i.c.v) de TRH disminuyó el tiempo de enterramiento, no modificó marcadores conductuales de motilidad y no provocó activación del eje tiroideo. Concluimos que: 1) en la cepa W, el TRH no hipofisiotrópico del hipotálamo participa en la conducta de ansiedad; 2) las diferencias conductuales y neuroendócrinas entre las dos cepas estudiadas pueden originarse a nivel central debido en parte a hiperactividad del eje Tiroideo 3) la vía TRHérgica amigdalina está inhibida durante el modelo de ED lo que puede contribuir al establecimiento del estado de ansiedad; 3) la administración de TRH exógeno disminuye el comportamiento de ansiedad sin provocar activación del eje tiroideo y 4) el locus de acción del péptido exógeno puede ser una región límbica como la amígdala en la que mostramos cambios endógenos de la vía de TRH durante el paradigma de ED.

II. ANTECEDENTES

1. HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA, TRH.

La hormona liberadora de tirotropina de estructura pyroGlu-His-Pro-NH₂ (figura 1), fue el primer péptido hipofisiotrópico caracterizado [Boler *et al.*, 1969; Burgus *et al.*, 1969]. Toma su nombre de su capacidad de estimular la síntesis y liberación de la hormona estimuladora de la tiroides o tirotropina (TSH) en la adenohipófisis [Haisenlender *et al.*, 1992] con lo que inicia la activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo (HHT).

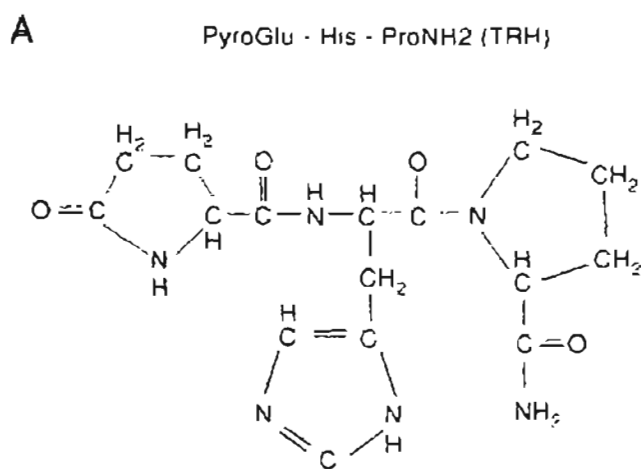


Figura 1. Estructura química de la Hormona Liberadora de Tirotropina. [Tomado de Zigmond *et al.*, 1999].

1.1 Biosíntesis y Procesamiento.

La biosíntesis y procesamiento de TRH, como muchos otros péptidos, es un proceso altamente regulado y que involucra la participación de múltiples enzimas. En el genoma de la rata, el gen que codifica para el TRH se presenta en una copia (figura 2). La unidad transcripcional contiene tres secuencias exónicas separadas por dos intrones. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida del RNAm; el exón 2 codifica para el N-terminal y el péptido señal del precursor. El exón 3 codifica para las 5 copias de TRH, péptidos cripticos y región 3' no traducida del RNA [Lee, 1988.].

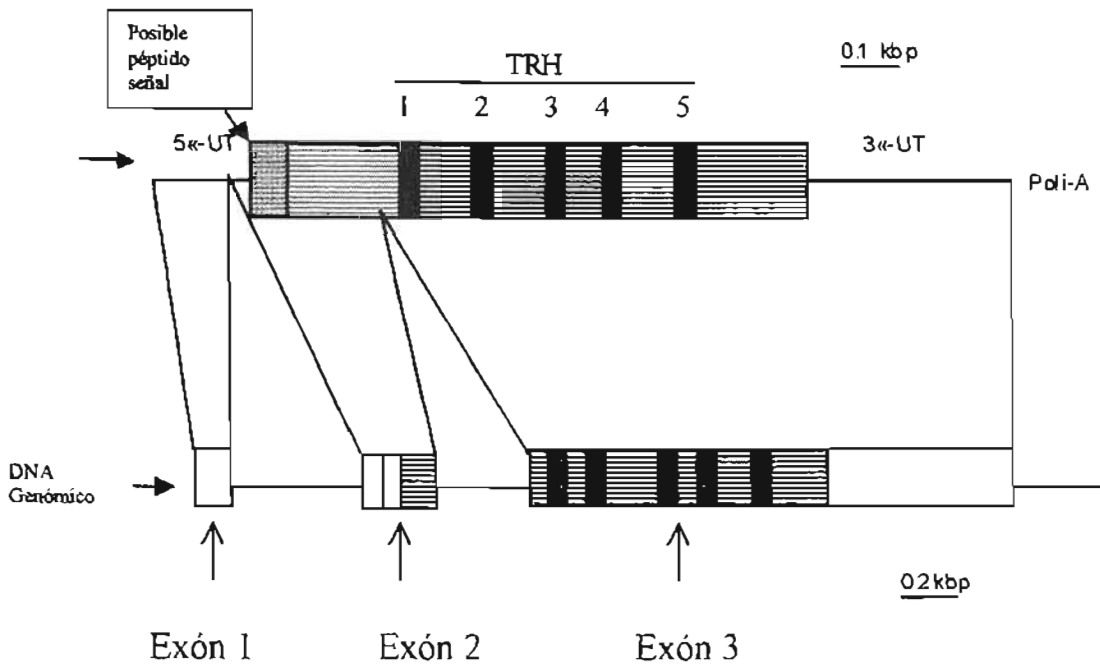


Fig. 2. Estructura del gen de TRH en la rata. En azul se muestran las copias de la secuencia de TRH

La síntesis comienza con la traducción del RNAm. La secuencia codificadora del TRH está repetida 5 veces en el gen de la rata (el gen humano contiene 6 copias) estas secuencias están flanqueadas por residuos de aminoácidos básicos (Lys-Arg ó Arg-Arg).

El producto de este gen es una molécula de alto peso molecular llamada pro-hormona que es posteriormente procesada [Yamada et al., 1990]. Durante la vía de secreción regulada, las convertasas PC1 y PC2 cortan la pro-hormona en los aminoácidos básicos, liberando tripéptidos de TRH flanqueados aún por estos residuos. La carboxipetidasa E remueve los aminoácidos básicos liberando la secuencia Gln-His-Pro-Gly. Este péptido es sustrato de la enzima peptidil glicil α mono-oxigenasa (PAM), que libera los carbonos dejando el grupo amida. Finalmente, el residuo amino terminal pyrro-Glu se origina por la ciclización de la Gln. La amida C-terminal y el ácido glutámico ciclizado del N-terminal son esenciales para la actividad del TRH (figura 3).

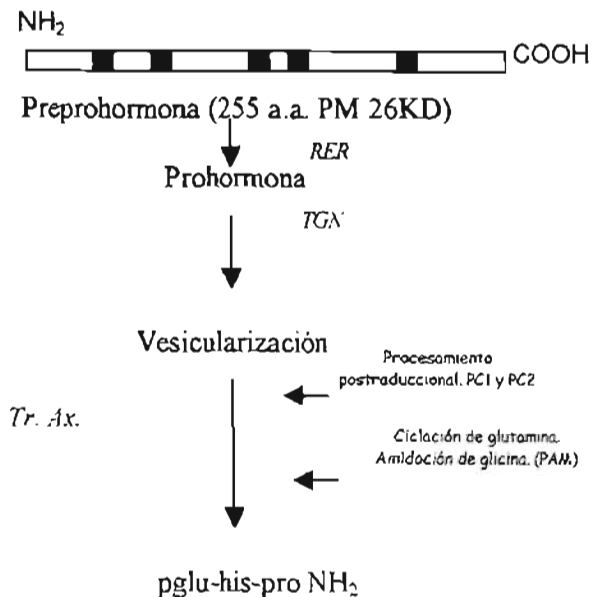


Figura 3. Procesamiento del TRH. La forma activa del TRH se deriva de procesos enzimáticos y transporte regulado que ocurren a lo largo de la neurona. RER: retículo endoplásmico rugoso. TGN: trans-golgi, Tr Ax.: transporte axonal.

1.2 Localización en el Sistema Nervioso Central (SNC).

Si bien el TRH se descubrió por su función neuroendócrina, sólo un tercio de la concentración total del SNC se localiza en el hipotálamo, en la porción medial parvocelular [Strand, 1999.]. Lechan (1986) reportó la presencia de RNAm de pro-TRH en densidades máximas (además del hipotalámico) en el bulbo olfatorio, núcleo caudado-putamen, núcleo reticular talámico y en el tallo cerebral (*Rafé obscurus/magnus* y núcleo trigeminal espinal) mientras que en hipocampo (giro dentado y *subiculum*), amígdala (lateral y basolateral), corteza (piriforme) y núcleo accumbens, encontró RNAm de pro-TRH en densidades moderadas. Usando antisuero que reconoce el proTRH, se han encontrado células inmunorreactivas en la materia gris periacueductal [Toni y Lechan, 1990; Nillni y Sevarino, 1999].

Por medio de métodos altamente sensibles como el radioinmunoensayo (RIA) y el conteo de células inmunorreactivas se puede detectar pericaria positiva para TRH en

hipocampo (CA2, CA3 y capa molecular); amígdala (núcleos medial y central) y fibras de TRH en núcleo accumbens, amígdala (mismos núcleos) hipocampo (*stratum oriens*), septum, cortezas frontal y piriforme, *locus coeruleus* y núcleo de Rafé, entre otras regiones. [Toni y Lechan, 1990; Nillni y Sevarino, 1999].

El TRH colocaliza con sustancia P (SP) y con serotonina (5-HT) en la médula espinal.

1.3 Receptores y localización

Hasta la fecha, se han caracterizado dos subtipos de receptores para el TRH: TRH-R1 [Straub et al., 1990] y TRH-R2 descrito en 1998 en el caso de la rata [Cao, et al., 1998] y en el caso del ratón por Itadani y colaboradores, en el mismo año [Itadani et al., 1998]. El análisis de secuencia del cDNA en las diversas especies en las que se ha descrito la presencia de los receptores, indica que ambos son miembros de la familia de receptores Rhodopsin / β adrenérgicos que pertenece a la super familia de receptores asociados a proteínas G. El análisis de secuencia de aminoácidos de los dos receptores en una misma especie indican un 50% de identidad [Gershengorn *et al.*, 2003]. Los TRH-R's están asociados a la proteína G_{aq} y/ o a la G_{q11} , cuando el ligando se une al receptor comienza la asociación de las proteínas G_{q11} . La transducción de la señal continúa con la activación de la fosfolipasa C (figura 4), estimulando la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5- P_2 (PIP_2) formando 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Estos segundos mensajeros provocan liberación de Ca^{2+} del retículo endoplásmico y eventualmente, un aumento en la concentración de Ca^{2+} libre intracelular y la activación de la proteína cinasa C (PKC) [Hsieh y Martin, 1992; Kiley *et al.*, 1991]. La activación de los receptores de TRH por su ligando también estimula a la proteína-cinasa activada por mitógeno (MAPK) [Kanda *et al.*, 1994; Omichi *et al.*, 1994].

En la transcripción génica mediada por el TRH se ha reportado la participación de diversos factores de transcripción. Por ejemplo, la activación de la PKC induce la expresión génica en parte vía el factor de transcripción activador de proteína-1 (AP-1) [Curran *et al.*, 1988] y la activación de la proteína-cinasa dependiente de

Calcio/Calmodulina puede inducir al factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta sensible al cAMP). La estimulación de la MAPK a través de la actividad del TRH-R1 promueve la actividad del factor de transcripción tipo-ETS gene-1 (Elk-1).

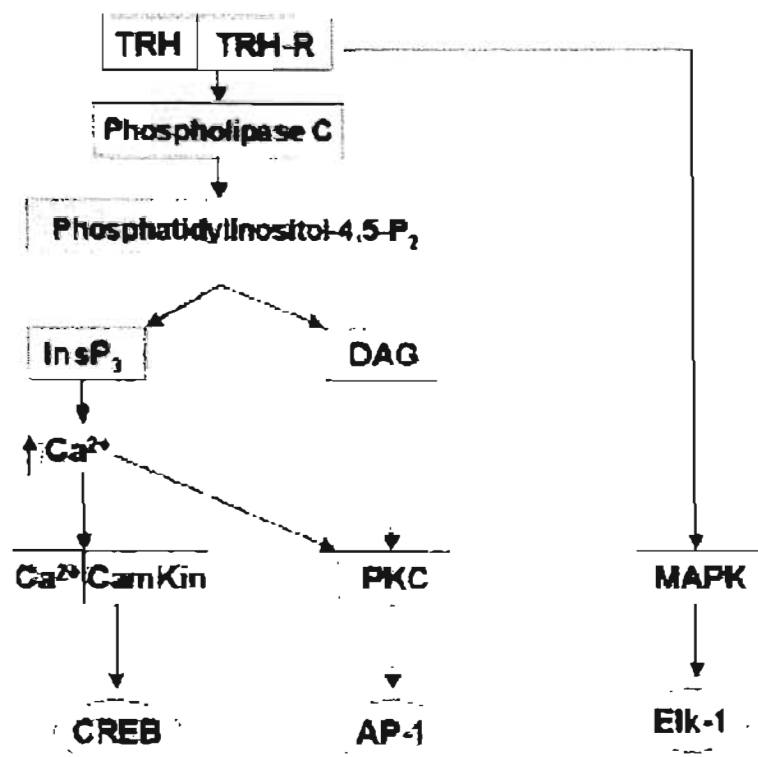


Figura 4. Esquema de las vías de señalización intracelulares que son activadas por la unión de TRH a sus receptores (TRH-R). La activación de los receptores de TRH promueve la activación de la proteína-cinasa dependiente de calcio/calmodulina (Ca²⁺/CamKin), de la proteína-cinasa C (PKC) y de la proteína activada por mitógeno (MAPK) e induce la transcripción génica por medio de los factores de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta sensible al cAMP), AP-1 (de transcripción activador de proteína-1), y Elk-1 (factor de transcripción tipo-ETS gene-1). InsP₃ inositol 1,4,5-trifosfato; DAG, diacil glicerol. [Gershengorn *et al.*, 2003]

Los receptores TRH-R1 y TRH-R2 presentan distribución anatómica muy diferente. De manera general, el TRH-R1 se encuentra predominantemente expresado en regiones relacionadas con la regulación neuroendócrina de eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo, el sistema nervioso autónomo y en regiones del tallo cerebral relacionadas con funciones viscerales. En contraste, el TRH-R2 se encuentra predominantemente expresado en áreas del sistema nervioso central que son importantes en la transmisión somatosensorial y funciones superiores [Gershengorn *et al.*, 2003].

El TRH-R2 está expresado extensamente en las neuronas piramidales de la corteza cerebral en todas sus capas [Heuer *et al.*, 2000], en las áreas somatosensoriales y motoras primarias, en el área primaria visual y en la corteza primarias olfatoria [O'Dowd *et al.*, 2000]. En contraste, la distribución regional del TRH-R1 se encuentra restringida a las cortezas peririnal, piriforme y al núcleo endopiriforme [Calza *et al.*, 1992] y su RNAm se encuentra sólo a bajas concentraciones.

En la formación hipocampal, el TRH-R2 se encuentra en abundancia en el hipocampo precomisural pero no en las neuronas piramidales [Heuer *et al.*, 2000]. Se ha reportado expresión relativamente alta del TRH-R1 en el giro dentado ventral [Calza *et al.*, 1992] así como presencia de la proteína en la región de CA3 [Zabavnik *et al.*, 1993].

En la amígdala, el TRH-R1 se expresa en altas concentraciones en los núcleos del complejo corticomedial, incluyendo al área amígdalohipocampal que recibe aferentes del bulbo olfatorio, hipotálamo y núcleos viscerales del tallo cerebral. Se ha detectado RNAm del TRHR-2 principal y casi exclusivamente en el complejo basolateral que recibe información cortical y talámica [Calza *et al.*, 1992; Heuer *et al.*, 2000; Zabavnik *et al.*, 1993].

En el hipotálamo, la mayoría de los núcleos expresan RNAm del TRH-R1 mientras que el RNAm del TRHR-2 se encuentra presente en concentraciones bajas o moderadas en el núcleo lateral anterior, en el área lateral hipotalámica y en la porción dorsal del núcleo ventromedial [Gershengorn *et al.* 2003].

1.4 Piroglutamil peptidasa II (PPII).

La PPII es una metalopeptidasa de especificidad restringida que hidroliza el enlace peptídico piroglutamil-histidil del TRH. Es una proteína integral de membrana con un dominio intracelular pequeño, un segmento transmembranal y un dominio extracelular grande. Se encuentra en grandes cantidades en el cerebro, específicamente presente en células neuronales; su inhibición incrementa la recuperación de los niveles de TRH

liberada *in vitro*. Estudios de hibridación *in situ* demuestran que su RNAm colocaliza con el RNAm del receptor TRH-R1 en varias regiones cerebrales.

Por lo anterior, se ha propuesto como la principal vía de inactivación del TRH extracelular [Charli *et al.*, 1994]. La actividad de la PPII es regulada positivamente por hormonas tiroideas y negativamente por estrógenos [Bauer, 1988] que actúan directamente en la adenohipófisis; el TRH, a través de la activación de su receptor TRH-R1, inhibe tanto la actividad de la PPII como los niveles de RNAm [Vargas *et al.*, 1998].

2. FUNCIONES NEUROENDÓCRINAS

2.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo.

El TRH hipofisiotrópico es sintetizado en las neuronas del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo que tienen sus terminales en la eminencia media (EM) en donde liberan el TRH que a través del sistema porta, llega a la adenohipófisis en donde se une específicamente al receptor TRH-R1 [Boler *et al.*, 1969] estimulando la secreción de tirotrópina (en los tirótrofos) y de prolactina (en los lactótrofos). La regulación del eje HHT constituye un sistema clásico de retroalimentación negativa en el que por un lado, el exceso de hormonas tiroideas (L-tiroxina o T4 y triiodotironina o T3) inhibe la secreción de TSH de la adenohipófisis [Mori *et al.*, 1987] y por otro, actúa también negativamente sobre las neuronas NPV que sintetizan TRH [Segerson *et al.*, 1987] (ver figura 5). El TRH participa en la liberación de otras hormonas, como son la hormona del crecimiento (GH) en la adenohipófisis -sobre todo en condiciones patológicas como el hipertiroidismo- ; la vasopresina en la neurohipófisis y la insulina en el páncreas [Nillni y Sevarino, 1999; Zigmond *et al.*, 1999].

El eje HHT regula la actividad metabólica de los organismos. Es regulado en situaciones de estrés fisiológico en el que las exigencias metabólicas cambian. Se ha comprobado que en modelos animales de estrés por frío el eje HHT se activa a

diferentes niveles: en las neuronas del NPV del hipotálamo, el RNAm del pro-TRH aumenta rápida y transitoriamente [Uribe et al., 1993]. La liberación de TRH de la EM aumenta y consecuentemente, la TSH y los niveles de hormonas tiroideas (T3, principalmente).

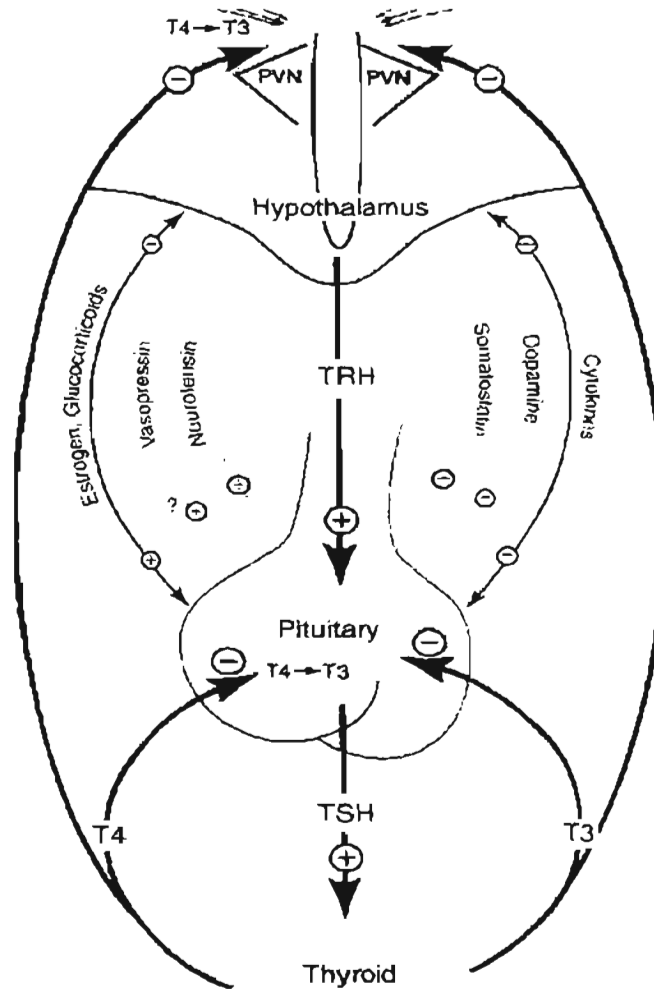


Figura 5. Regulación de eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroideo. El TRH es liberado del hipotálamo y en la hipófisis provoca la liberación de TSH. Ésta estimula la producción y liberación de hormonas tiroideas que a su vez, regulan negativamente al hipotálamo y a la hipófisis. [Tomada de Zigmond *et al.*, 1999].

2.2 El estrés y el Eje Hipotálamo-Hipófisis -Adrenal

La vida transcurre manteniendo un complejo y dinámico equilibrio llamado “homeostasis” que se encuentra bajo constantes retos externos e internos. Durante condiciones favorables, un organismo puede dedicarse a funciones como la alimentación y la reproducción, que garantizan el desarrollo y la supervivencia de su especie [Tsigos y Chrousos, 2002]. Bajo situaciones estresantes los organismos se enfrentan a retos y en consecuencia a ellos, se activan diversos circuitos que en conjunto dirigen la respuesta del organismo. Al conjunto de los circuitos que inician y mantienen estas respuestas se le denomina eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HHA). Este sistema responde, secretando esteroides catabólicos a la circulación sistémica [Herman *et al.*, 2002], a retos fisiológicos que amenacen la homeostasis del individuo y también a situaciones que sean percibidas como posibles amenazas (por ejemplo, presencia de un predador, reconocimiento de contextos previamente asociados a estrés). Los esteroides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) actúan sobre numerosos tejidos, incluyendo el cerebro en el que modulan la fisiología y el comportamiento [Munck *et al.*, 1984]. La activación del eje HHA comienza en el hipotálamo (en las neuronas del NPV) con la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (o CRH) que estimula la secreción de ACTH (corticotropina) de la adenohipófisis que a su vez, favorece la secreción de glucocorticoides de la glándula adrenal hacia la circulación periférica [McEwen y Stellar, 1993].

El CRH constituye el estímulo hipotalámico principal en el eje HHA. El CRH es un péptido de 41 amino ácidos descrito por Vale y colaboradores en 1981 [Vale *et al.*, 1981]. Cuando el organismo se encuentra bajo condiciones favorables, el CRH es secretado de manera circádica y pulsátil con 2 o 3 episodios por hora. Durante el reposo, existe un pico máximo en momentos previos al inicio del periodo activo del organismo (diurno para los humanos, nocturno para los roedores). Este patrón de secreción es sensible a cambios en la ingesta, a los periodos de sueño y a los de luminosidad [Van Cauter y Turek, 2001]

Durante estrés agudo, la amplitud de la secreción de CRH al sistema porta hipofisario aumenta sensiblemente lo que ocasiona un aumento en la secreción de ACTH y en los niveles sistémicos de corticosteroides.

La ACTH sistémica es el factor clave en la regulación de la secreción de glucocorticoides adrenales que son los efectores finales de la activación del eje HHA. Los glucocorticoides participan en el control de la homeostasis del organismo en situaciones estresantes: regulan la actividad del eje adrenal deteniendo la activación del eje al actuar en centros extrahipotalámicos. La retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre la secreción de ACTH limita la duración de la exposición del tejido a estas hormonas, minimizando sus efectos catabólicos, antireproductivos e inmunosupresores [Walter et al., 2001].

Los glucocorticoides ejercen sus efectos al unirse a receptores citoplasmáticos ubicuos. En presencia de su ligando, los receptores se translocan hacia el núcleo donde interactúan en forma de homodímeros con elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) en el DNA y regulan la transcripción de genes blanco [Gennady et al., 2001].

El estrés físico también es capaz de regular o causar una respuesta a nivel del eje HHT, a través del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) [Herman et al., 2002].

Se ha propuesto que los glucocorticoides disminuyen la activación del eje tiroideo actuando a nivel del SNC. Estos efectos pueden ser parcialmente explicados por una acción sobre la transcripción del gen de TRH pues éste contiene la secuencia del elemento de respuesta a corticosteroides y las neuronas hipofisiotrópicas TRHérgicas podrían estar sujetas a su acción ya que contienen receptores a glucocorticoides. Existen también evidencias indirectas que indican una relación entre estos 2 ejes como lo es el hecho de que el ritmo diurno en cortisol es opuesto al de TSH además, la administración exógena de este glucocorticoide es capaz de disminuir el pico nocturno de TSH.

La relación entre estos dos sistemas no siempre es antagónica. En ciertas patologías como la depresión, existe un aumento en los niveles tanto de cortisol (hipercortisolismo) como de hormonas tiroideas (hipertiroidismo). Los glucocorticoides tienen efectos sobre la transcripción del TRH tanto directamente, a través de la acción sobre su transcripción a nivel hipotalámico o bien, indirectamente al actuar sobre otros *loci* del SNC: los glucocorticoides pueden alterar la estructura y función de células del hipocampo y bloquear la retroalimentación negativa hacia el NPV. La pérdida de regulación de los sistemas extra hipotalámicos tiene efectos sobre las neuronas hipofisiotrópicas que se traducen en alteraciones de los ejes adrenal y tiroideo.

3. TRH EXTRAHIPOTALÁMICO

En el sistema nervioso central el TRH actúa como neurotransmisor y como neuromodulador, produciendo una amplia gama de efectos en el comportamiento que son independientes de su función periférica tiroidea [O'Leary y O'Connor, 1995].

El TRH ha sido propuesto como un activador neuronal ya que cuando es administrado sistémica o centralmente, aumenta el tiempo de vigilia [Arnold *et al.*, 1991] disminuye el tiempo de la narcosis inducida por β -endorfinas [Tache *et al.*, 1977], tetrahidrocanabinol [Bhargava y Matwyshyn, 1980], benzodiazepinas [Glue *et al.*, 1992], barbitúricos [Sharp *et al.*, 1984, Hashimoto *et al.*, 1993] y por etanol, así como los efectos hipotérmicos causados por éste [Breese *et al.*, 1974; French *et al.*, 1993].

También se ha demostrado que el TRH provoca mejoras en medidas conductuales de memoria y aprendizaje en donde los sistemas colinérgico y noradrenérgico parecen estar involucrados, siendo el TRH un facilitador de estas vías [Kasparov y Chizh, 1992; Itoh *et al.*, 1994 y Ogasawara *et al.*, 1996].

El TRH promueve la activación del sistema locomotor, cuando es inyectado al núcleo accumbens [Sharp *et al.*, 1984; Miyamoto y Nagawa, 1977], área ventral tegmental, caudado [Kalivas *et al.*, 1987], núcleos septales [Sharp *et al.*, 1985] o al hipotálamo

ventromedial [Shian *et al.*, 1985]. Se ha propuesto que estos efectos son principalmente mediados por el sistema dopaminérgico [Miyamoto y Nagawa, 1977].

Los experimentos de reversión del estado sedativo causado por la administración de drogas fueron extendidos al utilizar animales en estado de sedación natural, como ocurre en los animales que pasan por un período de hibernación. En éstos, el TRH inyectado en el hipocampo dorsal produce el restablecimiento de la actividad general del animal (Winokur, 1988) pero si el péptido se inyecta en animales conscientes, los efectos son inhibidores. Este fue uno de los primeros trabajos en los que se propuso que los efectos del TRH son estado-dependientes lo que resulta en el restablecimiento de la homeostasis del sistema [Gary *et al.*, 2003].

La inyección sistémica de TRH aumenta la liberación de dopamina (DA) en el núcleo *accumbens* [Heal *et al.*, 1981]; aumenta la actividad de la vía colinérgica en los sistemas septo-hipocampal y núcleo basal-cortical [Giovannini *et al.*, 1991]. Existen evidencias de que el TRH activa la vía GABAérgica y de que compite con el sitio de unión a las benzodiazepinas en el receptor ionotrópico GABA_A [Fleming y Todd, 1994].

4. FUNCIONES DEL SISTEMA LÍMBICO

Hemos mencionado que la administración del TRH despliega una serie de conductas que involucran al sistema límbico; además, tanto el TRH como los demás elementos que participan en la transmisión TRHérgica (los receptores TRH-R1 y TRH-R2, PPII) se encuentran también presentes en estas regiones. La siguiente sección describe antecedentes pertinentes a la comprensión del sistema límbico.

4.1 Las emociones son el resultado de procesos neurales.

Una de las primeras teorías sobre la generación de las emociones a nivel del sistema nervioso central fue la propuesta por Walter Cannon [Cannon, W. B, 1927] y Philip Bard [Bard, P., 1928] quienes propusieron que el hipotálamo era la región central en la generación de respuestas emocionales. Posteriormente, James Papez propuso un esquema de los circuitos neurales involucrados en las emociones, conocido como el

Circuito de Papez, figura 6 [Papez, J. W, 1937]. La idea central de su propuesta sostiene que los estímulos son recibidos en el tálamo de donde divergen hacia dos vías: la del “pensamiento” y la del “sentimiento”. La primera es transmitida del tálamo hacia las cortezas sensoriales, en particular, hacia la corteza cingulada. A través de este circuito, Papez propuso que las sensaciones eran transformadas a percepciones, pensamientos y memorias. La vía del sentimiento parte del tálamo hacia los cuerpos mamilares y de ahí hacia regiones periféricas, generando las emociones.

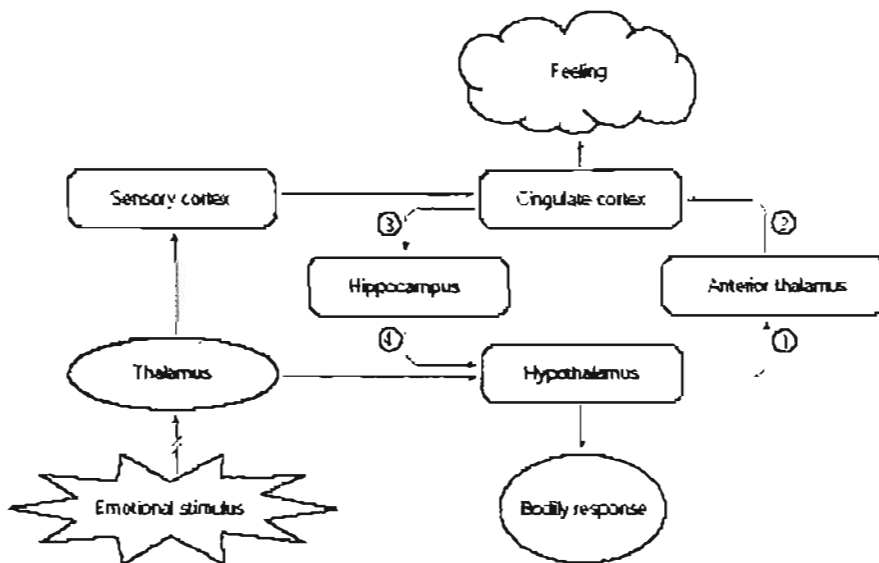


Figura 6. *Circuito de Papez.* Papez sostenía que los mensajes sensoriales concernientes a estímulos emocionales llegaban al tálamo de donde son enviados hacia la corteza (vía del pensamiento) y hacia el hipotálamo (vía de las sensaciones). Propuso una serie de conexiones del hipotálamo hacia el tálamo anterior (1) y hacia la corteza cingulada (2). Las experiencias emocionales ocurren cuando la corteza cingulada integra las señales provenientes del hipotálamo junto con información de las cortezas sensoriales. Eferencias de la corteza cingulada al hipocampo (3) y de éste al hipotálamo (4) permite control cortical (central) de las respuestas emocionales (Dalglish, 2004).

En 1949, Paul MacLean propuso un nuevo modelo al que llamó *Sistema Límbico* [MacLean, P. D., 1949]. Basado en las teorías anteriores y en nuevos estudios anatómicos que demostraban que los lóbulos temporales jugaban una parte central en la neurofisiología de las emociones [Kluver, H. y Bucy, P. C., 1937], MacLean dividió la arquitectura cerebral de las emociones en tres partes. La primera, compuesta por el complejo estriado y los ganglios basales, comprende los componentes más primitivos de las emociones (miedo y agresión). La segunda parte está compuesta por la mayoría de

las regiones que constituyeron el circuito de Papez además de la inclusión de la amígdala y la corteza prefrontal. Estas estructuras fortalecen las respuestas emocionales primitivas y elaboran también las emociones sociales.

Finalmente, el tercer componente de la teoría del Sistema Límbico de MacLean agrega la neocorteza como la región que aporta aspectos cognitivos a los emocionales y regula las respuestas periféricas desde el SNC. (ver figura 7.)

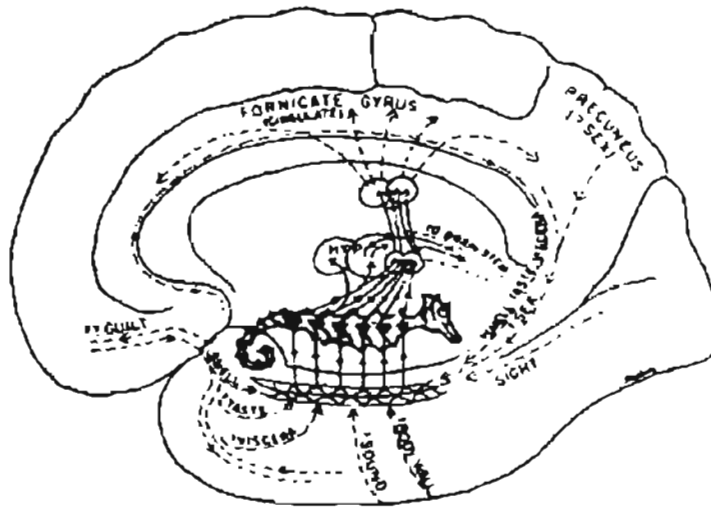


Figura 7. Sistema Límbico de MacLean. Teoría sobre la neuroanatomía funcional de las emociones. La estructura central de la teoría del sistema límbico de MacLean es el hipocampo (ilustrado como un caballito de mar). De acuerdo con MacLean, el hipocampo recibe entradas sensoriales del exterior así como información del estado interno del cuerpo. Las experiencias emocionales son una función de la integración de las vías de información interna y externa (Dalgleish, 2004).

4.2 Ansiedad

La ansiedad es un fenómeno humano emocional común que ocurre en respuesta a estresantes psicológicos o ambientales. Es una respuesta adaptativa pues permite el establecimiento de un estado de alerta y consecuentemente, el despliegue de conductas en respuesta al estímulo aversivo [Gross y Hen., 2004]. La ansiedad resulta patológica al presentarse ante un estímulo que no es ni nocivo ni amenazante, o incluso sin causa alguna [Clement y Chapoutihier, 1998]. Tanto el miedo como la ansiedad son elementos cruciales de la respuesta conductual y autonómica al estrés y han sido descritas en todos

los mamíferos por lo que se consideran mecanismos “universales” de adaptación a condiciones adversas. [Gross y Hen, 2004].

Sin embargo, la ansiedad patológica es una enfermedad de alta incidencia que puede interferir seriamente con el desarrollo de un individuo en sociedad y en su vida privada. La clasificación aceptada internacionalmente es la elaborada por la Asociación Americana de Psiquiatría en el Manual Diagnóstico y Estadístico (DSMMD IV Washington DC., 1994). En este documento se reconocen seis subtipos de ansiedad: trastorno de ansiedad generalizada, fobia social, fobia simple, trastorno de pánico, trastorno de estrés post-traumático y trastorno obsesivo-compulsivo. Los trastornos de ansiedad son las patologías psiquiátricas de mayor prevalencia tanto en México [Medina-Mora *et al.*, 2003] como en Estados Unidos [Lepine, 2002]. En ese país, estas patologías afectan al 13.3% de la población adulta (19.1 millones de personas en el rango de edad 13-54 años) [Anxiety Disorders Associations of America, 2003] y su tratamiento tiene un costo anual aproximado de 42 mil millones de dólares lo que constituye casi un tercio del presupuesto anual estadounidense en salud [Greenberg, 1999]. En México, un estudio realizado por el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, reporta que el 14.3% de la población mexicana adulta ha experimentado algún trastorno de ansiedad al menos una vez en su vida [Medina-Mora *et al.*, 2003]. Resulta evidente la necesidad de crear nuevas alternativas de atención y tratamiento de este tipo de padecimientos y un inicio fundamental para lograrlo es la investigación básica de los fenómenos bioquímicos y las alteraciones fisiológicas que subyacen a los trastornos de ansiedad.

4.3 Sustratos anatómicos de la ansiedad.

El organismo en conjunto está involucrado en la respuesta y modulación de los estados de ansiedad los cuales interactúan con todos los sistemas: motor, sensorial, endócrino, inmune, cardiovascular y por supuesto, el neural [Gross y Hen, 2004]. Los estudios farmacológicos, las investigaciones clínicas y en años recientes, el estudio a partir de animales genéticamente modificados, han demostrado que existe una gran diversidad de

mecanismos neuronales involucrados en la etiología, modulación y tratamiento de la ansiedad (Millan, 2003.).

Ya que la ansiedad es un tipo de emoción, las estructuras y circuitos mencionados en los párrafos anteriores están involucrados en su procesamiento, regulación y expresión. Una gran cantidad de estructuras límbicas y corticales interconectadas han sido implicadas en los mecanismos emocionales y cognitivos que subyacen los estados de ansiedad.

Se reconoce a la amígdala como el “epicentro” de los eventos que modulan las respuestas al miedo tanto en humanos como en animales experimentales y, como un sitio de acción de agentes que reducen la ansiedad (fármacos ansiolíticos). La amígdala posee un patrón extenso de conexiones recíprocas con estructuras corticales, límbicas, monoaminérgicas y otras estructuras involucradas en las respuestas conductuales, endócrinas, emocionales y autonómicas al estrés [Petrovich et al., 2001]. En la amígdala, las vías aferentes se derivan principalmente del núcleo central amigdalino (CeA) y de los núcleos basales de la “*estria terminalis*” (BNST) mientras que el complejo amigdalino basolateral (BLA) principalmente recibe y filtra entradas sensoriales corticales y subcorticales (del tálamo) [Petrovich et al., 2001 y Cardinal et al., 2002]. La amígdala proyecta a diversas regiones del hipotálamo que activan el sistema nervioso simpático y endócrino induciendo la liberación de las hormonas del estrés como la hormona liberadora de corticotropina (CRH) [Cardinal et al., 2002]. Otra proyección del núcleo central de la amígdala es la que conecta hacia diferentes sitios de la materia gris periacueductal que al ser estimulada inicia las respuestas analgésicas descendientes (que involucran a los opioides) que pueden entonces suprimir la sensación de dolor en una emergencia y que, al mismo tiempo, activan las respuestas al estrés especie-específicas, (por ejemplo, el comportamiento de congelamiento).

Evidentemente, tratar de explicar un fenómeno tan complejo como la ansiedad, considerando solamente una estructura del SNC como la amígdala sería cuando menos, reduccionista. Con el propósito de presentar un panorama más integral de los sustratos anatómicos involucrados en la ansiedad, a continuación describo dos modelos en los

que se proponen mecanismos y circuitos que están involucrados en las patologías y comportamientos de ansiedad. El primero presenta las relaciones entre diversos neurotransmisores que en concierto producen un estado de tipo ansioso, mientras que el segundo propone un modelo en el que se resalta la activación del eje neuroendócrino que controla la secreción de glucocorticoides.

Tanaka y colaboradores publicaron en el 2000 un modelo en el que consideran que, el aumento de noradrenalina (NA) liberada en el hipotálamo, la amígdala y el *locus coeruleus* durante la exposición a estímulos aversivos o amenazantes es el evento más importante en la generación de un estado de ansiedad. Los estímulos estresantes del ambiente, así como algunos fármacos típicamente ansiogénicos (yohimbina que actúa vía los α -adrenoreceptores y β -carbolinas vía los receptores a benzodiazepinas, como agonista inverso) aumentan la liberación de noradrenalina en el hipotálamo, la amígdala y el *locus coeruleus* provocando ansiedad. Las situaciones estresantes y las vías CRHérgicas pueden también aumentar la actividad noradrenérgica y por lo tanto estar involucradas en la ansiedad. Por otro lado, los ansiolíticos actúan vía los receptores a benzodiazepinas, fortaleciendo la vía GABAérgica, o vía los receptores a opioides como la morfina y la met-enkefalina. En ambos casos, sus efectos son la atenuación del aumento de liberación noradrenérgica, disminuyendo la ansiedad y el miedo.

Otra aproximación a los mecanismos que se activan en los estados de ansiedad es la sobre-activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). Se postula que los mecanismos de retroalimentación negativa normales están alterados y como resultado, los niveles de corticosteroides sanguíneos permanecen altos durante largos periodos de tiempo. Los corticosteroides estimulan las vías CRHérgicas en la amígdala central y en los núcleos basales del estriado que proyectan al *locus coeruleus*, donde activan vías noradrenérgicas. En el NPV fortalecen la vía CRHérgica que desciende al tallo cerebral estimulando vías noradrenérgicas. En el núcleo de Rafé, estimulan la actividad serotoninérgica. Las vías noradrenérgicas innervan el hipocampo, la amígdala y la corteza mientras que la vía serotoninérgica proyecta hacia el hipocampo, la amígdala y el septum. El aumento de la neurotransmisión noradrenérgica y serotoninérgica en regiones límbicas causan un estado de ansiedad.

Los dos modelos mencionados ilustran la complejidad de los fenómenos emocionales como la ansiedad, en donde las interacciones entre señales químicas y sustratos neuronales actúan en concierto causando respuestas fisiológicas y conductuales complejas.

5. MODELOS ANIMALES DE ANSIEDAD

Los modelos animales de patologías humanas han sido utilizados para ayudar a identificar las anormalidades bioquímicas y fisiológicas que acompañan al estado patológico, así como para dirigir las estrategias en su tratamiento [Secar *et al.*, 2001.] Por esta razón, los modelos animales son una herramienta indispensable para estudiar los trastornos del comportamiento.

En la caracterización de los estados de ansiedad y su modulación, el uso de modelos conductuales es indispensable. Existe una gran variedad de paradigmas experimentales de ansiedad que involucran comportamientos naturales o aprendidos (no-condicionados y condicionados) [Millan, 2003.]. Sin embargo, una de las grandes dificultades en el diseño y uso de éstos es la falta de parámetros concretos que reflejen “ansiedad” *per se*. Las respuestas provocadas en los animales son fisiológicas y no patológicas aún así, los modelos son diseñados de tal manera que producen reacciones fisiológicas similares a las patologías humanas. El conocimiento que se tiene hoy en día sobre los trastornos emocionales se debe, en gran medida, a los estudios realizados a partir de modelos animales.

En los modelos animales de ansiedad, la respuesta del animal a la situación a la que es sometido en las pruebas es adaptativa, por lo que en éstos se mide un estado fisiológico y no uno patológico. Sin embargo, la diferencia entre los cambios bioquímicos que ocurren en la ansiedad fisiológica y los de la patológica, son la intensidad y la frecuencia, por lo que estos modelos pueden tener un valor predictivo para el estado patológico. Estos experimentos se han enfocado en medidas fisiológicas y conductuales que se parezcan a las observadas en la ansiedad humana así como en procedimientos conductuales que permitan la identificación de agentes farmacológicos que reduzcan o

eliminen específicamente la ansiedad patológica. Lo primero permite determinar los eventos causales y las alteraciones bioquímicas y fisiológicas concomitantes asociadas a la ansiedad; lo segundo, permite dilucidar manipulaciones ambientales y farmacológicas que puedan modificar la ansiedad [Weiss y Uhde, 1990].

Se han diseñado una gran variedad de modelos animales que examinan de manera particular la gran variedad de factores involucrados en la ansiedad, éstos pueden clasificarse en tres grupos. En el primero las pruebas están basadas en conflicto o en miedo condicionado. En el segundo, la ansiedad es generada por un estímulo novedoso y en la tercera, la ansiedad es inducida químicamente [Koob *et al.*, 1998].

Las tres características básicas de los modelos animales de ansiedad son: selectividad, potencia relativa y sensibilidad dosis-dependiente. La selectividad se refiere a que el modelo no esté afectado por sustancias que sean efectivas en otros modelos de desórdenes del comportamiento. La potencia relativa implica que la magnitud del efecto sobre el parámetro conductual indicativo de ansiedad, es diferente al usar diferentes tratamientos o fármacos. La sensibilidad dependiente de la dosis indica que la conducta ansiosa del animal variará dependiendo de la cantidad de fármaco administrada.

Otra herramienta muy útil en el estudio de la ansiedad, es utilizar cepas de animales que han sido seleccionadas por tener características útiles en el estudio de patologías humanas. Un ejemplo de esto es la cepa de ratas llamada Wistar Kyoto que fue originalmente criada como el control normotenso de las ratas espontáneamente hipertensas (SHT) [Okamoto y Aoki, 1963]. La cepa Wistar Kyoto se caracteriza por mostrar respuestas conductuales y fisiológicas exageradas ante un estresor bajo una gran variedad de situaciones en comparación con otras cepas. En respuesta a situaciones estresantes, presentan secreción aumentada y mantenida de ACTH [Rittenhouse *et al.*, 2002; López-Ruvalcaba y Lucki, 2000], son más susceptibles a desarrollar úlceras gástricas de mayor tamaño y severidad en comparación con otras cepas [Paré, 1990 y Paré, 1994] y despliegan conductas indicativas de mayor estrés como la de congelamiento (el animal permanece sin movimiento pero tenso) ante un estímulo

aversivo. Se ha propuesto como una cepa severamente ansiosa [Paré, 1994; Paré, 1992] en la que probablemente la causa del estado de ansiedad sea la regulación deficiente del eje adrenal o su alta sensibilidad al estrés ambiental.

5.1 Modelo de Ansiedad de Enterramiento Defensivo

El modelo de ansiedad utilizado en este trabajo se denomina “Modelo de Enterramiento Defensivo” (ED). Fue propuesto en 1981 por Treit, Pinel y Fibiger para medir los efectos ansiolíticos de fármacos como el diazepam, clordiazepóxido y pentobarbital. Puede clasificarse dentro de los modelos que inducen ansiedad por un estímulo novedoso (Treit et al., 1981).

En el modelo de ED se utiliza una caja de acrílico que tiene alrededor de 5 cm de aserrín fino en el fondo y un electrodo insertado a través de una de las paredes. Durante los 3 días previos a la prueba, los animales son habituados al ambiente de experimentación para lograr que las respuestas se deban al procedimiento experimental y no a la manipulación. En el día de la prueba, el animal es introducido a la caja de experimentación, la explora y eventualmente se encontrará con el electrodo. Cuando el animal entra en contacto con él, ocurre una descarga eléctrica leve de 0.3 mA. La reacción del animal generalmente es la de enterrar el electrodo con el aserrín hasta que lo esconda dado que éste es identificado como la fuente de los estímulos aversivos. La prueba dura 10 minutos y cada sujeto experimental es sometido una sola vez al protocolo de experimentación.

El comportamiento se registra de acuerdo a los siguientes parámetros [Treit, 1981]:

- Latencia de enterramiento (LE); tiempo registrado desde el inicio de la prueba hasta que la rata empieza a enterrar el electrodo. Es una medida de reactividad.
- Tiempo de enterramiento (TE); tiempo total que las ratas emplean en enterrar el electrodo. Es la medida directa de ansiedad en la que a mayor tiempo de enterramiento, más ansiedad

- Número de choques recibidos antes de empezar a enterrar el electrodo, después de desplegar dicha conducta, y en total.
- Número de exploraciones al electrodo.
- Numero de exploraciones al aire.
- Observaciones generales del comportamiento del animal durante la prueba. (congelamiento, acicalamiento, movimiento excesivo, etc.)

La prueba se registra en un sistema de videograbado, de tal manera que el investigador no interfiere en la prueba mientras ésta se lleva a cabo y el análisis del comportamiento puede realizarse con mayor precisión. Los experimentos se realizan en el periodo de oscuridad del ciclo luz-oscuridad de las ratas, tomando en cuenta que estos animales son nocturnos, por lo que se encuentran más activos en la fase oscura de su ciclo.

El modelo de ED posee ventajas que lo hacen especial. 1) Para los roedores, el comportamiento de enterramiento es innato; el animal no tiene que aprender a reaccionar ante el estímulo aversivo del choque eléctrico por lo que su respuesta es muy cercana a lo que ocurriría en la naturaleza. 2) La medida conductual que indica ansiedad, es un comportamiento activo por lo que resulta evidente y sencillo detectar y cuantificar cambios que alteren esta respuesta. 3) Se ha probado que este modelo es sumamente sensible puesto que la respuesta de ED, depende tanto del estado hormonal como de la etapa del desarrollo en que se encuentre el animal (López-Ruvalcaba *et al.*, 1996). Estas características hacen ideal el uso de este modelo en este trabajo, debido al objetivo de encontrar cambios endógenos en una vía de señalización y relacionarlos con parámetros conductuales.

6. TRH Y MODELOS ANIMALES DE PATOLOGÍAS HUMANAS.

Existe evidencia clínica que sugiere la participación del TRH en patologías humanas emocionales como la depresión. En pacientes clínicamente deprimidos, se ha documentado un aumento en concentraciones de TRH en el fluido cerebro-espinal [Nemeroff y Evans, 1989 y Fossey et al., 1993] y tanto en depresión como en trastornos

de ansiedad, se ha reportado que la secreción de TSH al torrente sanguíneo en respuesta a un estímulo de TRH a nivel hipofisiario, es exagerada en comparación con la secreción que ocurre en individuos clínicamente sanos [Loosen y Orange, 1998 y Tukul et al., 1999] que es indicativo de una regulación deficiente del eje HHT en estas patologías.

Existe una relación evidente entre los trastornos de ansiedad y la depresión que puede deberse a sustratos anatómicos comunes, tanto a nivel neuronal como en los ejes neuroendócrinos. Lo que sí es claro, es que la concurrencia de estos dos fenómenos es altísima.

Utilizando modelos animales de depresión, se ha tratado de determinar si el TRH posee actividad antidepresiva [Prange et al., 1972]. Aunque los resultados no han sido contundentes, [Drago et al., 1990 y Thomson y Rosen 2000] se ha podido establecer que la inyección periférica y central de TRH disminuye marcadores conductuales de depresión en la prueba de nado forzado de Porsolt [Porsolt et al., 1977 y 1978] [Drago et al., 1990, Pecara, 1997 y Satín y Pecara 1992].

Han sido pocos los estudios en los que se analice la función del TRH en la ansiedad. La mayoría de éstos analizan los efectos de TRH exógeno sobre medidas conductuales. Uno de estos trabajos es el reportado por Thomson y Rosen en el 2000 en el que demuestran que la administración intracerebroventricular (i.c.v.) de 12.5 µg TRH disminuye la amplitud de la respuesta al sobresalto acústico. Este efecto es independiente de la activación del eje HHT pues no altera la concentración sérica de T3 ni T4. Los autores proponen que el TRH puede reducir niveles de miedo o ansiedad aunque también se considera que los efectos observados se podrían deber a que el TRH aumente la actividad locomotora del animal o a que el TRH afecte el estado de alerta y no el miedo o ansiedad únicamente [Thomson y Rosen, 2000].

III. HIPÓTESIS

1. HIPÓTESIS GENERAL

Cambios en contenido de TRH y/o de su RNAm en regiones del sistema límbico de ratas sometidas al modelo de ansiedad de enterramiento defensivo permiten involucrar a la vía TRHérgica en los procesos centrales relacionados con la conducta de ansiedad.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La actividad de una vía peptidérgica puede ser medida indirectamente cuantificando diferentes elementos durante la síntesis, transporte, maduración, liberación e inactivación de un péptido.

El TRH se deriva de una molécula mucho más grande [Yamada et al., 1990] que es procesada enzimáticamente desde su sitio de síntesis en el citoplasma hasta el de su liberación en la terminal sináptica. Una vez maduro y empaquetado en vesículas de liberación, en respuesta a estímulos eléctricos, éstas vesículas se funden con la membrana de la terminal sináptica y el péptido es liberado al espacio extracelular en donde puede difundirse azarosamente hasta establecer un contacto específico molécula-molécula (con sus receptores específicos o con la enzima que lo degrada).

La vida media del TRH libre en el espacio extracelular es muy corta (en el plasma es de 5 min.) debido a la gran eficiencia degradadora de la enzima responsable de su inactivación, la PPII que se encuentra localizada en las membranas de las terminales sinápticas de las neuronas presumiblemente post-sinápticamente [Joseph, 1994]. Se ha demostrado que las enzimas citosólicas que degradan a la TRH no están sujetas a regulación y, al menos que por algún proceso patológico el péptido se libere de la vesícula al interior de la célula, las peptidasas no tienen acceso al TRH [Charlí, 1998]. Por lo anterior, se considera que el contenido de TRH de un tejido en un momento específico refleja la cantidad de péptido intracelular y no el péptido en el espacio extracelular. En nuestro trabajo el *contenido de TRH por región* es un indicador directo de la cantidad de TRH maduro y que se encuentra listo para ser liberado al espacio extracelular: los cambios en el contenido tisular reflejarán, principalmente, cambios en liberación. A los tiempos utilizados en este trabajo (30 y 60 min) proponemos que los

cambios en concentración de TRH son debidos al aumento o a la disminución en la liberación de TRH.

La cuantificación del RNAm del pro-TRH nos indica, por otro lado, la activación biosintética de la neurona en donde un aumento en el mensajero de la pro-hormona es interpretado como un aumento en la síntesis, sobretodo cuando va acompañado de una disminución en la concentración de TRH en la misma región. Si bien esta es la interpretación más inmediata, nuestro protocolo experimental no permite afirmar que los cambios en el RNAm se reflejen en cambios en la cantidad de péptido maduro o biológicamente activo. No se han hecho experimentos de pulso y caza, que indiquen el tiempo que tardaría un aumento en los niveles de RNAm en reflejarse en aumento de concentración de TRH. Evidencias con otros péptidos, y en células en cultivo hacen suponer que el tiempo mínimo para ver un aumento en TRH a partir de un aumento en la síntesis, es de 2 h. A los tiempos definidos en este trabajo, no esperamos detectar, a nivel del péptido maduro, los cambios que observamos en el mensajero.

En respuesta a un estímulo neural como la exposición al frío (que activa el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo) o la succión de las crías (que causa una liberación en prolactina) los niveles de RNAm de pro-TRH aumentan en forma rápida y transitoria (60 y 30 min respectivamente) y se observa un aumento en la concentración de tirotropina sérica [Uribe, et al. 1993 y Uribe et al., 1991]. En el sistema límbico, la estimulación eléctrica subumbral de la amígdala, incrementa los niveles de RNAm de Pro-TRH y se presentan cambios en el contenido de TRH que correlacionan con la actividad epileptogénica de las regiones [de Gortari, et al., 1998; de Gortari, et al., 1998]. Esto nos permite hipotetizar que las alteraciones en los niveles TRH ó de su RNAm implican participación de las neuronas TRHérgicas ante un estímulo estresante.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL:

Establecer si la vía TRHérgica participa en la conducta de ansiedad en un modelo animal.

2. OBJETIVOS PARTICULARES:

Analizar el efecto del estrés en los cambios bioquímicos del metabolismo del TRH.

Evaluar la posible participación de la vía TRHérgica en la conducta de ansiedad analizando su metabolismo en estructuras del Sistema Límbico de la rata durante la prueba de Enterramiento Defensivo por medio de:

- Cuantificación del contenido de TRH por RIA,
- Análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-TRH y de sus receptores (TRH-R1 y TRH-R2) por medio de RT-PCR

Comparar la conducta y el metabolismo del TRH de las cepas Wistar y Wistar Kyoto durante el Enterramiento Defensivo.

Evaluar el posible efecto de la administración central de TRH exógeno en el comportamiento de ansiedad.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES Y MODELO EXPERIMENTAL

1.1 Animales

Se utilizaron ratas macho adultas (249-350 g) de las cepas Wistar (n = 30) y Wistar Kyoto (n = 55) se mantuvieron en grupos de 10 por caja, en el bioterio del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Sur del Instituto Politécnico Nacional (IPN) con ciclos de luz-oscuridad invertidos (periodo de luz de 22:00-10:00); con acceso *ad libitum* a agua y comida. Los cuartos de habituación y experimentación estuvieron frente al bioterio bajo el mismo ciclo de luz-oscuridad y las pruebas se realizaron durante la fase oscura del mismo. Una vez concluido el tratamiento, los animales fueron sacrificados por decapitación. Para el experimento de inyección de TRH se utilizaron 20 ratas de la cepa Wistar (bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM) de 286-352 g se mantuvieron hasta el día de la cirugía en cajas de 10 ratas en el bioterio del Instituto Mexicano de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz con agua y comida *ad libitum* (LabDiet). Después de la cirugía las ratas se mantuvieron en cajas individuales y fueron manipuladas diariamente en las instalaciones del mismo bioterio. Excepto el grupo control intacto que no fue manipulado. Las implantaciones de cánulas fueron realizadas por Adrián Martínez en el laboratorio de electrofisiología. Las habituaciones, inyecciones de TRH, pruebas conductuales y sacrificio fueron realizados en el laboratorio de Farmacología Conductual. Ambos laboratorios pertenecen al área de Neurociencias del Instituto Mexicano de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz (IMP-RFM). Después de los tratamientos, las ratas fueron sacrificadas por decapitación.

1.2 Prueba de Enterramiento Defensivo (ED)

Todas las pruebas de ED se realizaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación, independientemente de la cepa de ratas o del tratamiento.

Durante los tres días previos a la prueba conductual los animales fueron habituados al contacto humano, al cuarto de experimentación y a la *cámara de experimentación* sin electrodo una vez por día.

La prueba duró 10 min y cada animal era expuesto a ella una sola ocasión. La *cámara de experimentación* era de acrílico y dimensiones de 27 x 16 x 23 cm. Al inicio del experimento, las ratas son colocadas en la esquina opuesta al electrodo y el investigador abandona el cuarto. Frente a la cámara se colocó una videograbadora [Sony] que registró todos los movimientos del animal durante la prueba. Después de 10 minutos, se retiró a la rata de la caja de experimentación, se detuvo la grabación y se limpió el aserrín y la caja.

Parámetros conductuales:

A partir de las cintas de video de los animales sometidos a la prueba de ansiedad, se cuantificaron los siguientes parámetros: Tiempo de enterramiento (*TE* en segundos), latencia al enterramiento (*LE* en segundos), número de choques totales (*CH*), choques antes (*CHa*) y choques después (*CHd*) de que el animal desplegó el comportamiento de ED. También se cuantificaron las exploraciones al aire (*EA*), se tomó en cuenta como exploración cuando el animal mantuvo una posición vertical con ambas extremidades superiores suspendidas en el aire y las exploraciones al electrodo (*EE*) que ocurrían cuando el animal se acercaba al área del electrodo sin que recibiera una descarga.

2. PARADIGMA A

Estos experimentos se complementan con un experimento anterior en el que se utilizaron 40 ratas macho adultas de la cepa Wistar y que es referido como **Experimento Preliminar.**

Se realizaron dos protocolos de enterramiento defensivo utilizando ratas macho adultas intactas. En el primero se utilizaron ratas de la cepa Wistar Kyoto (WKY) ($n = 25$) y en el segundo, se utilizaron ratas tanto de la cepa Wistar como de la Wistar Kyoto ($n = 30$ de cada cepa). Todas las ratas fueron habituadas los 3 días previos al experimento.

2.1 Grupos

1. *Control Habitado (CH)*: Ratas sacrificadas directamente, es decir, sin otro periodo de manipulación $n = 6$ *.
2. *Controles experimentales (CE)*: Ratas que fueron habituadas por cuarta ocasión. Se subdividió este grupo en dos en función del tiempo transcurrido desde el término de la habituación hasta el momento de sacrificio, que fue de 30 ó 60 min (**CE 30** y **CE 60**, respectivamente) $n = 6$ *.
3. *Experimentales (E)*: Ratas sometidas al protocolo de enterramiento defensivo. Se subdividió este grupo en dos nuevos en función del tiempo transcurrido desde el término de la prueba y hasta el momento de sacrificio, que fue de 30 ó de 60 min (**E 30** y **E 60**, respectivamente) $n = 6$ *.

*excepto un experimento de la cepa Wistar Kyoto que tuvo $n = 5$ en cada grupo.

3. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

3.1 Preparación de muestras

Los animales se sacrificaron por decapitación en los tiempos definidos por el grupo al que pertenecieran, se colectó la sangre y una vez coagulada se separó el suero centrifugando a $5000 \times g$ durante 10 min y se guardó a -20°C hasta la cuantificación de corticosterona y tirotopina séricas. Los cerebros se extrajeron, se colocaron en hielo seco y se almacenaron a -70°C en un ultracongelador [Thermo forma ultra freezer].

Se utilizó el atlas de Palkovits [Palkovits y Brownstein, 1988] para realizar los cortes y diseccionar hipotálamo, núcleo accumbens, corteza frontal, amígdala, hipocampo y septum. En uno de los experimentos, el hipotálamo se dividió en medio basal (eminencia media, EM) y región medial superior (que contiene el NPV). Todas las disecciones se realizaron sobre hielo seco. El lado izquierdo y el derecho se almacenaron por separado (tubos Eppendorf nuevos) en un ultracongelador a -70°C , ya que el lado derecho de todas las regiones y en el caso del hipotálamo, el corte que contenía al PVN, se utilizaron para el análisis semi-cuantitativo de RNA mensajero de TRH, de sus receptores (TRH-R1 y TRH-R2), de CRH y de GR por RT-PCR. Los lados izquierdos

de cada región y el corte que contenía la eminencia media (EM) del hipotálamo, fueron utilizados para el radioinmunoensayo de TRH.

3.2 *Extracción de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)*

Los tejidos se sonicaron en 500 µl de ácido acético [Merck] al 20 %. El homogenado se centrifugó a 20800 x g durante 15 min a 4° C [Eppendorf Centrifuge 5810 R]. Se obtuvieron 420 µl del sobrenadante al que se agregaron 800 µl de metanol al 100% [J.T. Baker], se agitó [Daigger Vortex Genie 2] y se mantuvieron a -20° C durante 12 horas [Congelador y Refrigerador General Electric Profile]. Las muestras se centrifugaron a 10500 x g durante 15 min a 4° C; el sobrenadante se recuperó y secó en el concentrador por vacío [Speed Vac Concentrator Savant]. El sedimento se utilizó para la cuantificación de TRH por radioinmunoensayo.

3.3 *Radioinmunoensayo (RIA) de TRH*

El RIA es un ensayo de “unión competitiva” que se basa en la competencia entre el ligando frío de las muestras y el marcado, en este caso, TRH-iodinado (I^{125} TRH). El anticuerpo anti-TRH y las condiciones de ensayo fueron previamente optimizadas [Joseph-Bravo *et al.*, 1979; Méndez *et al.*, 1987]

El TRH se iodizó por el método de cloramina T utilizando I^{125} [Perkin Elmer] y una columna de sephadex.

El RIA se llevó a cabo en una solución amortiguadora de fosfatos 50 mM a pH 7.5 (Becker) y 25% BSA. Las muestras problema, antígeno estándar o iodinado, así como el anticuerpo se diluyeron en esta solución.

Los extractos de tejido se resuspendieron en buffer-RIA: hipotálamo y corteza: 500 µl.; núcleo accumbens, septum, amígdala e hipocampo: 250 µl.; hipotálamo mediobasal (EM): 2 ml.

Mezcla de incubación

100 µl. de anticuerpo contra TRH (R_2),

100 µl de solución conteniendo TRH estándar o muestras problema (extractos)

100 µl de buffer RIA conteniendo 5000 cpm de I^{125} TRH.

Para la preparación de la curva estándar se hicieron, previamente, diluciones de TRH [Sigma] que contenían en 100 µl concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg de TRH y se analizaron por triplicado.

Se incluyó, además, un “estándar interno” que consistió en un extracto de hipotálamo de rata utilizado a 4 diluciones. Éste debe comportarse en forma paralela a la curva estándar y debe dar valores equivalentes en los RIAs realizados a distintos tiempos.

A los tubos de 0 pg, no se añade muestra problema ni estándar (se añadió buffer, marca y anticuerpo); a éstos se les denominó B₀. Adicionalmente, se prepararon 3 tubos que contenían únicamente 100 µl de I¹²⁵ TRH que no fueron centrifugados para obtener la radiación total (cuentas totales = T). Las muestras problema se analizaron por duplicado. Se preparó un tubo de pegado inespecífico que sólo contenía marca I¹²⁵ TRH y 200 µl de buffer.

Los tubos se agitaron y se dejaron incubar durante 36-48h a 4°C. Posteriormente, se añadió 1ml de etanol frío [Merck] se agitaron (precipitación del antígeno unido al anticuerpo) y se centrifugaron a 980 x g por 30 min a 4°C [Beckman J-6B]. El sobrenadante se succionó con un extractor en la cámara de radioinmunoensayo y se leyeron las cuentas por minuto (cpm) en un aparato de conteo de radiaciones gamma [LKB Wallace Miligamma Counter].

Se transformaron los valores en cpm de las curvas estándar y de las muestras utilizando el Software “enri” de transformación matemática a través de una regresión logit-log, a picogramos (pg) de TRH. Los RIA tenían una variación intra e interensayo del 15% y sensibilidad entre 20 y 2000 pg.

3.4 Radioinmunoensayo de TSH

Se realizó una dilución 1:3 de todas las muestras de suero problema por duplicado, tomando: 50 µl de suero y 150 µl de buffer RIA (50 mM de fosfato a pH 7.5 y 150 mM de NaCl [J.T. Baker]).

El anticuerpo (Ab) contra TSH [NIDDK] se preparó a una dilución de trabajo de 1:375,000.

La TSH fue indinada (¹²⁵I-TSH) [NIDDK] por el método de Cloramina-T y la solución de trabajo contenía 10,000 cpm en 100µl.

Mezcla de incubación

100 µl de anticuerpo contra TSH

200 µl de solución conteniendo TSH estándar o muestras problema

100 µl de amortiguador RIA conteniendo 10,000 cpm de (¹²⁵I-TSH).

Para la preparación de la curva estándar se hicieron, previamente, diluciones de TSH estándar [NIDDK] que contenían: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg en 200 µl.

Se incluyó un estándares interno que consistió en un extracto de suero de rata utilizado a 4 diluciones que debe comportarse en forma paralela a la curva estándar y debe dar valores equivalentes en los RIAs realizados a distintos tiempos.

A los tubos de 0 pg, sólo se añadió buffer RIA 200 µl, 100 µl de anticuerpo y contra TSH [NIDDK] (a una dilución 1:375,000) y 100 µl de marca radioactiva. A éstos se les denominó B₀.

Los tubos del pegado no específico contenían 300µl de amortiguador RIA y 100 µl de marca radioactiva.

Tubos de cpm totales: 100 µl de ¹²⁵I-TSH [NIDDK].

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 24 horas.

Posteriormente se añadió la ¹²⁵I-TSH [NIDDK] en un volumen de 100 µl que contenía 10, 000cpm y se dejó incubar por otras 24 hrs. a temperatura ambiente.

A todos los tubos, exceptuado sólo a los totales, se añadieron 100 µl del anticuerpo contra IgG de conejo [Chemicon] a una dilución 1:40 (dando una concentración de 2.5%) en PBS (50mM Fosfatos a pH 7.5 y 150mM NaCl) y 100µl de suero normal de conejo [Chemicon] al 2% en PBS.

Se dejaron incubar a temperatura ambiente por 2 hrs.

El antígeno no unido al anticuerpo, se separó mediante la adición de 1 ml de una solución de polietilenglicol al 4 % en PBS. Los tubos se centrifugaron a 980 x g durante 30 min. Los sobrenadantes se succionaron con un extractor en la cámara de radioinmunoensayo y se leyeron las cuentas por minuto (cpm) en un aparato de conteo de radiaciones gamma [LKB Wallace Miligamma Counter]. Se transformaron los valores en cpm de las curvas estándar y de las muestras a nanogramos de TSH por

mililitro de suero utilizando el Software "enri". Los RIA tenían una variación intra e interensayo del 10%.

3.5 Radioinmunoensayo de Corticosterona

Se realizó una dilución 1:1000 de todas las muestras de suero tomando: 10 µl de suero y 5 ml de buffer diluyente de esteroides (50 mM de fosfato a pH 7.5 y 150 mM de NaCl [J.T. Baker]). Se tomaron 500 µl de las diluciones de todas las muestras.

El anticuerpo (Ab) contra corticosterona [ICN Farmacéutica] se diluyó a partir de alícuotas de 20µl de una dilución inicial de 1:12 para obtener una dilución de trabajo de 1:1200.

La corticosterona tritiada (³H-Cor) [Amersham] contenía 100 cpm/µl (1 µl de ³H-Cor contenía 900,000 cpm se diluyó en 9 ml de amortiguador diluyente de esteroides para obtener alícuotas de trabajo que contenían 100 cpm/µl).

Mezcla de incubación

100 µl de anticuerpo contra Corticosterona

500 µl de solución conteniendo Corticosterona estándar o muestras problema

100 µl de amortiguador diluyente de esteroides conteniendo 10000 cpm de (³H-Cor).

Para la preparación de la curva estándar se hicieron, previamente, diluciones de Corticosterona estándar [ICN Farmacéutica] que contenían una concentración de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg en 500 µl.

A los tubos de 0 pg, no se añadió muestra problema ni estándar (se añadió buffer, anticuerpo y marca) a éstos se les denominó B₀.

Los tubos del pegado no específico contenían 600µl de amortiguador diluyente de esteroides y marca radioactiva.

Tubos de cpm totales: 100 µl marca ³H-Cor.

Los tubos se agitaron e incubaron a 98°C durante 10 min, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se incubaron, nuevamente, durante 24 horas a 4° C. El antígeno no unido al anticuerpo, se separó mediante la adición de 200 µl de una solución carbón-dextrán a 4° C agitada durante 20 seg e incubada durante 20 min a 4° C. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 980 x g durante 15 min. Los sobrenadantes, se transfirieron

a tubos para conteo de radiaciones β y se les adicionaron 4ml de líquido de centelleo [Ecolite, ICN]. Cada tubo se midió en el aparato de conteo de radiaciones β [Beckman] durante un minuto, empezando por la curva estándar. Se transformaron los valores en cpm de las curvas estándar y de las muestras a nanogramos de corticosterona por mililitro de suero utilizando el Software “enri”.

3.6 Extracción de RNA total.

Se utilizó el método de tiocianato de guanidina descrito por Chomczynski y Sacchi en 1987. Todo el material fue esterilizado previamente en autoclave [Tuttnauer Brinkmann 2540 M] por 40 min a 121° C. Todas las soluciones utilizaron agua tratada con DEPC [Sigma] (0.1 % v/v DEPC) y esterilizada.

Los tejidos se sonicaron [Sonics Vibra Cell Ultrasonic Procesor], con solución desnaturalizante de trabajo (por cada 50 ml de “solución D almacenable”, se añadía 350 μ l de β -mercaptoetanol [Sigma]) preparada el día de la extracción a partir de “la solución D almacenable” (250 g tiocianato de guanidina [Sigma] disueltos en 293 ml de agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato, 17.6 ml de 0.075 M de citrato de sodio a pH 7 [J.T. Baker] y 26.4 ml de sarcosil al 10 % en agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato). La solución de trabajo fue: 4M de tiocianato guanidina, 25 mM citrato de sodio a pH 7, 0.5 % sarcosil y 0.1 M β -mercaptoetanol). Los períodos de sonicación no excedieron los 5 seg a un máximo de 9 watts, y los tubos (eppendorf) eran mantenidos a 4° C. Los volúmenes de sonicación fueron los siguientes: hipotálamo y región hipotalámica que contenía al PVN, 150 μ l; núcleo accumbens y septum, 250 μ l; corteza frontal y amígdala, 500 μ l y 750 μ l para hipocampo.

Posteriormente, se agregó agitando con vortex a cada paso, 1/10 del volumen del homogenado, de acetato de sodio 2 M pH 4.0 [Sigma], un volumen de fenol saturado en agua [Sigma], 0.2 volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico 49:1 v/v [Sigma]. Las muestras se dejaron reposar durante 15 min en hielo y se centrifugaron a 10500 x g por 20 min a 4° C. Se recuperó la fase acuosa, se agregó un volumen de isopropanol [Sigma] y se guardaron todas las muestras a -20° C por 2 horas. Las muestras se

centrifugaron a 18000 x g por 20 min a 4° C, se obtuvo el sobrenadante con cuidado y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente por 7 min máximo. Las muestras se resuspendieron en solución D (1/3 del volumen inicial del homogenado), se agregó agitando cada vez: un volumen de fenol saturado en agua, un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico 49:1 v/v y centrifugaron (10500 x g por 22 min). A la fase acuosa se agregaron 2 volúmenes (del homogenado inicial) de etanol absoluto [Merck], se agitaron y guardaron a -20° C toda la noche. A la mañana siguiente, se centrifugaron a 20800 x g por 30 min a 4° C; se retiró con cuidado el sobrenadante y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente (max 7 min). Se añadieron 250µl de etanol al 75% y se agitó hasta despegar la pastilla de RNA precipitada, se centrifugó nuevamente por 15 min, se repitió el lavado con etanol al 75 %.

Finalmente, se extrajo el exceso de etanol con micropipeta y se obtuvo el precipitado de RNA total, el cual se resuspendió en 50µl de agua tratada con DEPC y esterilizada recientemente. Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (2µl de muestra en 500 µl de agua destilada) [Eppendorf BioPhotometer] a 260, 230 y 280 nm. Sólo se utilizaron para la transcripción reversa, muestras cuya relación 260/230 fuera >1.5. Si ésta resultaba menor a 1.5, se agregaba al resuspendido: 1/25 de su volumen inicial (2 µl) de acetato de sodio 2 M pH 4.0 y 3 volúmenes (150 µl) de etanol absoluto para eliminar sales. Se mantenían a -70° C toda la noche y al día siguiente se repetían la última centrifugación y los lavados con etanol al 75 %.

Las muestras cuyas relaciones 260/230 y 260/280 fueron mayores a 1.5 se consideraron adecuadas para la reacción de RT-PCR. Se prepararon alícuotas que contenían 1mg de RNA, tomando en cuenta que $DO \text{ a } 230 \text{ nm} \times \text{Factor de dilución} \times 40/1000 = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$.

3.7 Procedimiento de RT-PCR

Preparación del DNAc

Las alícuotas de 1µgRNA/12 µl de agua se incubaron a 65° C por 5 minutos (Multi-Block Heater Lab-Line), se les dio un pulso en una centrífuga [Eppendorf Centrifuge

5417C] y se les agregó 20 µl la mezcla de reacción que consistió en: 8.9µ H₂O bidestilada estéril con DEPC, 6.0 µl de Buffer RT 5x [Invitrogen] (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl y 15mM Mg₂Cl), 3.0 µl de dithiothreitol (DTT) 0.1 M [Invitrogen], 0.6 µl mezcla de deoxinucleótidos -dNTPs- 10 mM (10 mM de cada uno de los siguientes; dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro [Invitrogen]), 1.0 µl Oligo dT 0.5 µg/ µl y 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT 200 U/ µl [Invitrogen].

Las reacciones de retrotranscripción se incubaron por 2 horas a 37° C [baño Lauda E 100 006T]. Al término de la incubación, se tomaron alícuotas de 4, 5 o 6 µl del DNAC.

PCR

Las amplificaciones de las secuencias de interés se realizaron por separado. Para las reacciones de amplificación de TRH, CRH y GR se utilizaron 6µl de cDNA. En las amplificaciones de ciclofilina, que fue usada como control interno, se utilizaron 4 µl de cDNA. En las de los receptores de TRH R1 y R2 se utilizaron 4 y 5µl, respectivamente.

La mezcla de reacción para la RT-PCR fue: 34, 35 o 36µl de H₂O bidestilada (dependiendo del volumen de cDNA utilizado), 5 µl de Amortiguador de Reacción 10 x (KCl 500 mM, Tris-HCl pH 8.3 100 mM) [Biotecnologías Universitarias], 1.0 µl dNTP's 10 mM (10 mM de cada uno de los siguientes; dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro [Invitrogen]), 1µl (100 ng/ µl) de oligonucleótido de iniciación *-primers-* sentido y antisentido de cada uno de los genes blanco (TRH; TRH-3s: 5'GAC-AGC-TAG-TGA-AGG-GAA-CAG-G; TRH-4as 5'CCT-GTT-CCC-TTC-ACT-AGC-TGT-C; CRH; CRHs 5' GAC-CGC-CTC-CCT-CTC-TCC-AG y CRH as 5' GCC-CCG-CAG-CCG-TTG-AA; GR s 5'AAA-AAG-CAC-ATC-ACA-CAT-AAA-TCT-G y GR as 5' TAA-ATA-AGA-GGG-AGC-AAA-CTA-CTG-G; TRH R1 s 5'ACC-CAG-AGA-AGC-AGG-CAG-CGT-GAC-A y TRH R1 as 5' AGA-TCC-GCC-ACA-GCC-AGA-CTC-ACC-AG; TRH R2 s 5'GTC-TTC-CTA-GTG-CTC-CTG-GTG-TG y TRH R2 as 5' ACC-ACG-AAG-GGT-CCG-ATG-AAA-AAG; ciclofilina s 5'GGG-GAG-AAA-GGA-TTT-GGC-TA y ciclofilina as 5' ACA-TGC-TTG-CCA-TCC-AGC-C) [IBT, UNAM], 2.5µl Cloruro de Magnesio 30 mM [Biotecnologías Universitarias] y 0.5 µl de

la enzima Amplificasa ADN Polimerasa Termoestable (5U/ul) [Biotecnologías Universitarias].

Se realizaron cinéticas de amplificación (variando el número de ciclos) para determinar las condiciones óptimas de las RT-PCR, variando el número de ciclos de amplificación para los oligonucleótidos de TRH y ciclofilina en las regiones hipotálamo (NPV) y amígdala. En las siguientes tablas se muestran las condiciones de las cinéticas.

Habiendo definido las condiciones óptimas de amplificación, las muestras se colocaron en un termociclador [Eppendorf Mastercycler Gradient] bajo las siguientes condiciones: “X” número de ciclos (ver tablas) de 1’15’’ a 95° C, 1’00’’ a Tm específica, 1’00’’ a 72 ° C y 1 ciclo final de 15’ a 72° C. En las tablas se muestran las especificaciones para cada región y oligonucleótido.

Tablas de condiciones de amplificación.

HIPOTALAMO					
	Tm	Oligos (pmol)	Ciclos	RNA(μg)	cDNA(μl)
TRH	64°	25	24	1	6
Ciclofilina	64°	50	22	1	4
CRH	64°	25	32	1	6
GR	64°	10	27	1	6
R2 TRH	67°	25	30	1	5
R1TRH	64°	25	35	1	4

AMÍGDALA					
	Tm	Oligos (pmol)	Ciclos	μg RNA	cDNA (μl)
TRH	64°	25	28	1	6
Ciclofilina	64°	50	22	1	4
CRH	64°	25	27	1	6
GR	64°	10	27	1	6
R2 TRH	67°	25	34	1	5
R1TRH	64°	25	35	1	4

NÚCLEO ACCUMBENS E HIPOCAMPO					
	Tm	Oligos(pmol.)	Ciclos	RNA(μg)	cDNA (μl)
TRH	64°	25	30	1	6
Ciclofilina	64°	50	22	1	4

3.8 Análisis semi-cuantitativo de RNAm

Se realizaron geles de agarosa (ultrapure DNA grade agarose, BioRad) al 2 % en cámaras para electroforesis [Owl] utilizando como amortiguador de corrida TBE (Trizma base HCl electroforesis de BioRad) al 0.5 %. Por cada carril se agregó 10 µl de la reacción de RT-PCR de TRH, TRH-R1, TRH-R2, CRH ó GR (muestras problema), 5 µl de la de Ciclofilina (como controles internos).

Los geles fueron posteriormente teñidos en una solución de bromuro de etidio [Sigma] con agua destilada (0.006 %) durante 10 min en un agitador [Junior Orbit Shaker Lab. Line Instruments] y lavados en una charola con agua destilada en agitación durante 15 minutos.

Los geles se digitalizaron en un analizador de imágenes [BioRad Multianalyst], el cual analiza las densidades de bandas, transformándolas en unidades ópticas. Los valores de las banda de DNA de TRH, CRH, GR, TRH R1 y TRH R2 se relacionaron con el de ciclofilina (cDNA muestra problema/cDNA Cyc) y se obtuvieron unidades arbitrarias que pueden compararse entre sí.

4. PARADIGMA B

4.1 Experimento de inyección de TRH

Con el objetivo de analizar el efecto del TRH exógeno sobre la conducta de ansiedad y poder comparar con resultados en los que participa la vía TRHérgica endógena, inyectamos i.c.v 5µl de una solución 34.5 nM de TRH (12.5 µg) [Thomson y Rosen, 2000] a ratas macho adultas de la cepa Wistar en el ventrículo lateral Bregma, -0.8mm: Lateral, 1.2 mm y Vertical 3.2 mm.

4.2 Cirugía

Se anestesiaron 15 ratas (286-352g., al día de la implantación) con ketamina y rompún (75mg/12.5 mg/i.p.) y se les rasuró el área del cráneo que fue limpiada con lavados

subsecuentes de isodine, alcohol y solución salina. Utilizando un aparato de estereotaxia (ASI instruments), se ajustó la orientación del cráneo posterior y anteriormente para lograr una perpendicular respecto a la cánula. Se midieron las coordenadas de partida de cada animal (a partir del bregma de cada cráneo) y se localizó el punto de perforación con las siguientes coordenadas del atlas Paxinos y Watson [1988] para el ventrículo lateral [Sarkar, 2002]: Bregma, -0.8mm: Lateral, 1.2 mm y Vertical 3.2 mm. Una vez marcado el sitio de perforación (lado izquierdo), se trepanó el cráneo con un taladro y se colocó la cánula en las coordenadas establecidas, dejándola 0.8mm por arriba de la coordenada vertical. La perforación fue sellada con cera y la cánula fijada con cemento. Cuando éste secó, se taparon las cánulas.

Posterior a la cirugía, que duró entre 40 min y 1h, los animales fueron colocados en cajas individuales y se mantuvieron en el laboratorio hasta su recuperación de la anestesia, bajo una lámpara para mantener la temperatura corporal. Una vez que despertaron de la anestesia y que se confirmó su estado, fueron regresadas al bioterio. La recuperación de la cirugía fue de 17 días mínimo y cada día se revisaba el estado de los animales, de las cánulas y de la herida. Durante la recuperación se mantuvieron en cajas individuales con acceso libre a comida (LabDiet) y agua. Una rata perdió la cánula en este período por lo que no fue incluida en el estudio.

4.3 Grupos

En este paradigma se utilizaron 19 ratas que fueron divididas en los siguientes grupos:

1. *Grupo Salino (Sal)*: Las ratas de este grupo (n = 7) fueron inyectadas (i.c.v.) con un volumen de 5µl de solución salina estéril libre de pirógenos, en un tiempo de 3 min por medio de un inyector automático y fueron sometidas al modelo de ED 20 min después del término de la inyección. El sacrificio (por decapitación) se realizó 1h después de haber concluido la prueba conductual.
2. *Grupo TRH (TRH)*: Las ratas de este grupo (n = 7) fueron sometidas al mismo protocolo de experimentación que las del grupo salino pero la inyección que se les

aplicó fue de una solución de TRH 34.5 nM que contenía 12.5 µg de TRH y que fue preparada el día del experimento.

3. *Grupo Control Intacto (CI)*: Sacrificio directo, no fueron operadas, habituadas ni manipuladas (n = 5).

Todas las pruebas conductuales fueron videograbadas para el análisis posterior de los videos y la cuantificación de los parámetros conductuales.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se realizaron análisis de varianzas (ANOVA; Software StatView) de una vía para comparar los resultados obtenidos del contenido de TRH y del análisis semi-cuantitativo de los RNAm de TRH, R1-TRH, R2-TRH, CRH y GR por región de cada experimento. Se realizaron pruebas post-hoc de Fisher [Software StatView] considerándose una diferencia estadísticamente significativa cuando la $p < 0.05$.

Para comparar los parámetros conductuales entre cepas, se utilizó la prueba de T de Student. Se consideró que existía diferencia significativa si la p resultaba < 0.05 .

V. RESULTADOS

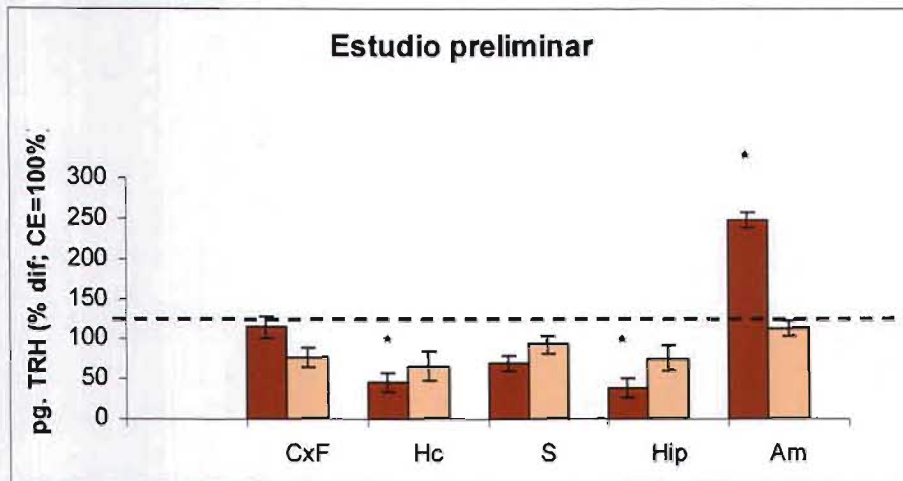
1. EXPERIMENTO PRELIMINAR

Como una primera aproximación para averiguar el papel del TRH endógeno en respuestas emocionales ante un evento estresante, se realizó un estudio preliminar [Gutiérrez-Mariscal, M. 2002] utilizando el modelo de ansiedad de enterramiento defensivo (ED) con la cepa Wistar. En este estudio se utilizaron grupos de 8 ratas macho que fueron sometidas a la prueba conductual. Los grupos utilizados fueron los mismos que los descritos en los métodos. Se cuantificó el contenido de TRH en corteza frontal (CxF), hipocampo (Hc), septum (S), hipotálamo (Hip), y amígdala (Am). Se encontró un aumento en contenido de TRH en la amígdala y disminuciones en hipotálamo e hipocampo (gráfica 1). Posteriormente se analizó semi-cuantitativamente (por RT-PCR) el RNAm de pro-TRH en estas regiones y se encontró que en la amígdala, el RNAm de este tri-péptido estaba disminuido mientras que en el hipotálamo había un aumento. El hipocampo no mostró diferencias entre los grupos experimentales y los controles en RNAm de pro-TRH (gráfica 2).

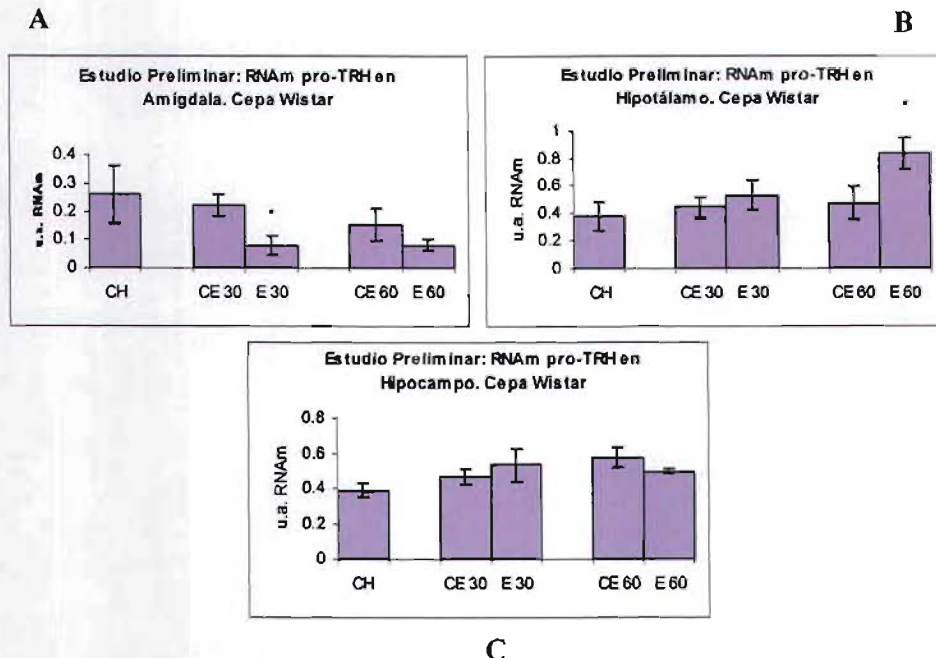
En este proyecto de maestría ampliamos nuestro estudio analizando no sólo contenido de TRH y de su mensajero sino también otros marcadores de la vía TRHérgica y del eje HHA. También incluimos en este estudio a la cepa Wistar Kyoto que difiere de la Wistar tanto en medidas conductuales como en su respuesta fisiológica al estrés

2. PARÁMETROS CONDUCTUALES: PARADIGMA A

La cepa de ratas Wistar (W) mostró mayor actividad durante la prueba de ED en comparación con la cepa Wistar Kyoto (WKY). La gráfica 3 muestra que las ratas W exploraron en más ocasiones el electrodo (panel A: W, 7.32 ± 0.89 exploraciones vs WKY, 1.86 ± 0.32 exploraciones) y el ambiente (panel A: W, 17.36 ± 1.22 exploraciones vs WKY, 11.14 ± 1.01 exploraciones) y recibieron mayor cantidad de choques eléctricos (Panel B: W, 12.76 ± 1.74 número de choques vs WKY, 4 ± 0.51 número de choques), de hecho las ratas W recibieron, en promedio, 4.97 ± 0.59 choques antes de enterrar el electrodo, que representa prácticamente el doble de los que recibieron las ratas WKY (2.27 ± 0.27).



Grafica 1. Contenido de TRH por región en ratas Wistar sometidas a la prueba de ED y sacrificados 30min (barras oscuras) ó 60min (barras claras) después de la prueba. Las unidades están expresadas en porcentajes en donde el 100% (línea discontinua) corresponde al promedio de pg de TRH de los grupos controles experimentales respectivos (CE 30 y CE 60). * y + indican diferencias significativas ($p < 0.05$).



Grafica 2. Análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-TRH en regiones del sistema límbico. Ratas Wistar sometidas a dos días de habituación y sacrificadas al 3er día (CH ó control de habituación); grupos habituados en tres ocasiones y sacrificados 30 ó 60 min después del último (CE ó controles experimentales); y grupos habituados en dos ocasiones, expuestos a la cámara con electrodo y sacrificadas 30 ó 60 min después (E ó experimentales). ANOVA una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa con $p < 0.05$. A: ($F_{4,40} = 4.4992$) Amígdala el grupo E 30 fue diferente del grupo CE 30 y de CH. B: ($F_{4,40} = 2.433$) Hipotálamo, el grupo E 60 fue diferente de su control experimental (CE 60) y de CH. C: ($F_{4,40} = 3.103$) Hipocampo, no se detectaron diferencias.

Las ratas W enterraron por más tiempo el electrodo (panel C: W, 187 ± 30.11 seg vs WKY, 71 ± 15.4 seg) y todas (25 en total) exhibieron la conducta de enterramiento defensivo, aunque el tiempo que invirtieron en hacerlo varió. Por el contrario, las ratas WKY (22 en total) invirtieron mucho menor tiempo en promedio enterrando el electrodo y de hecho, 3 de ellas lo hicieron por menos de 5 segundos y 1 no desplegó esta conducta.

3. CONTENIDO DE CORTICOSTERONA EN SUERO CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO

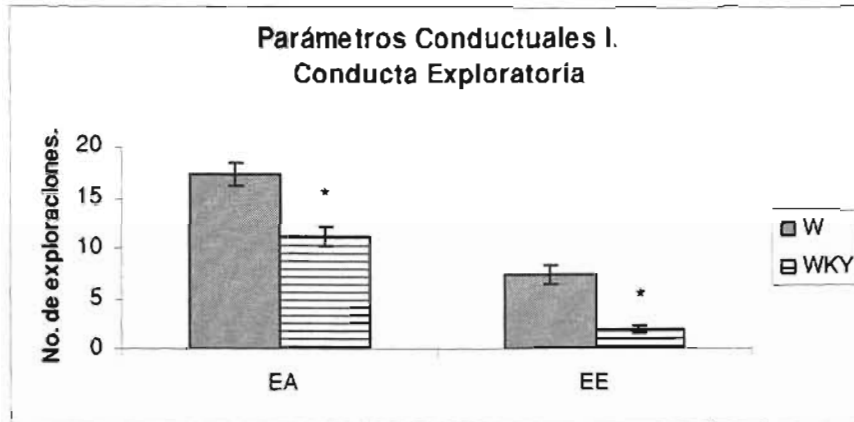
En el estudio preliminar (cepa Wistar) se detectó un aumento significativo en corticosterona sérica en el grupo experimental sacrificado 30 min después de terminar la prueba (E 30, gráfica 4). La diferencia fue significativa al comparar con el control habituado y con los dos grupos de 60 min (CE 60 y E 60).

En la cepa WKY no detectamos aumento en corticosterona sérica en los grupos experimentales como resultado de estrés causado por los choques eléctricos (gráfica 5), pero sí un descenso que resulta significativo entre el grupo habituado (CH: 1069.3 ± 97.5 ng/ml) y los grupos CE y E. Cabe resaltar que el grupo CH de la cepa WKY fue el que presentó mayor concentración de corticosterona en suero en comparación tanto con los otros grupos de esta cepa y como con todos los de la W.

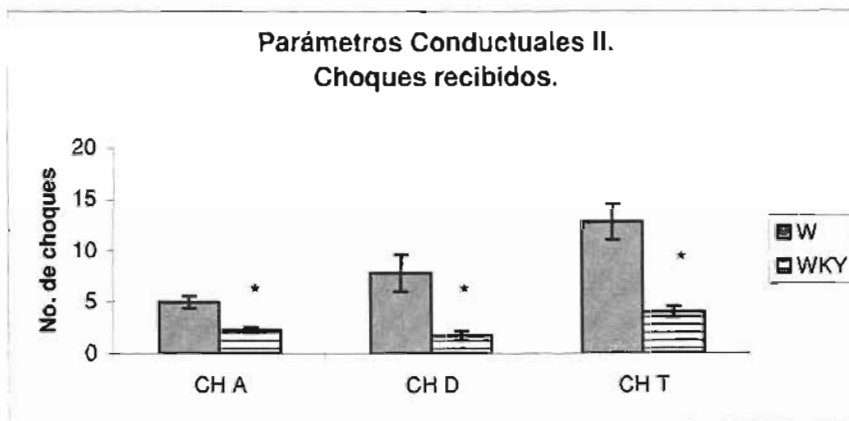
4. ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DEL RNAM DE PRO-CRH Y DE GR EN EL HIPOTÁLAMO DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO.

En la Gráfica 6 se muestran los resultados del análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-CRH y del receptor a glucocorticoides GR en el hipotálamo medial superior (que contenía al NPV principalmente, ver métodos). En los paneles A y B se observan las gráficas que corresponden a la cepa W y los paneles C y D las de la cepa WKY. En la primera (paneles A y B), no observamos diferencias en ninguno de los grupos ni en el RNAm de pro-CRH ni en el de GR. En contraste, en la cepa WKY sí detectamos diferencias significativas en estos parámetros: en el panel C, se observa que el grupo experimental de 30 min (E 30) tuvo un aumento en el RNAm de pro-CRH en el hipotálamo. El aumento es significativo en comparación con su control experimental (CE 30) que no fue diferente del control habituado (CH) lo que indica un efecto específico del estrés causado por los choques eléctricos.

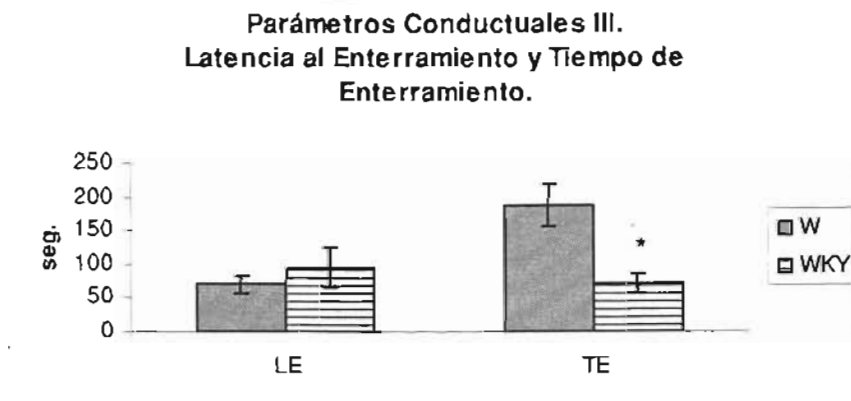
A



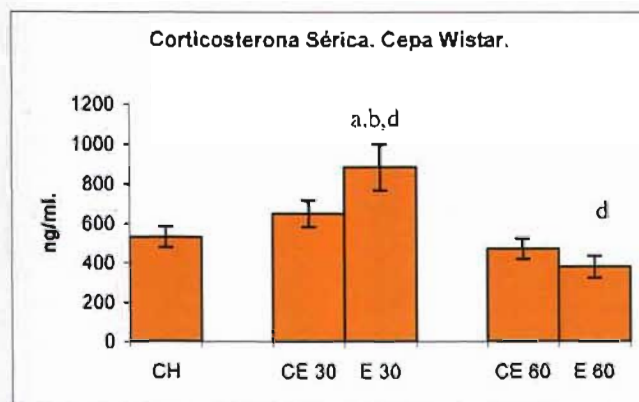
B



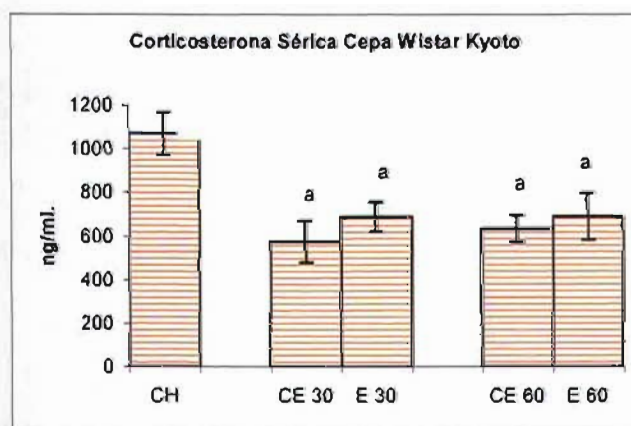
C



Gráfica 3. Parámetros Conductuales. Ratas que fueron sometidas al modelo de ED de la cepa Wistar (W, barras sólidas) y de la cepa Wistar Kyoto (WKY, barras rayadas). A. Exploraciones al aire (EA) y Exploraciones al electrodo (EE). B. Número de choques eléctricos recibidos antes (CH A), después (CH D) de enterrar el electrodo y en total (CH T). C. LE: Latencia al enterramiento y TE: tiempo de enterramiento. Los asteriscos indican diferencias significativas por pruebas de t-student y $p < 0.05$.



Gráfica 4. Contenido de corticosterona sérica Estudio Preliminar, cepa Wistar. CH: control de habituación; CE 30 y CE 60: grupos controles experimentales; E 30 y E 60: grupos experimentales. ANOVA de una vía ($F_{4, 34} = 6.873$ $p = 0.004$) y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, considerándose significativa con $p < 0.05$. E 30 es diferente de CH (a), de CE 30 (b) y de E 60 (d).

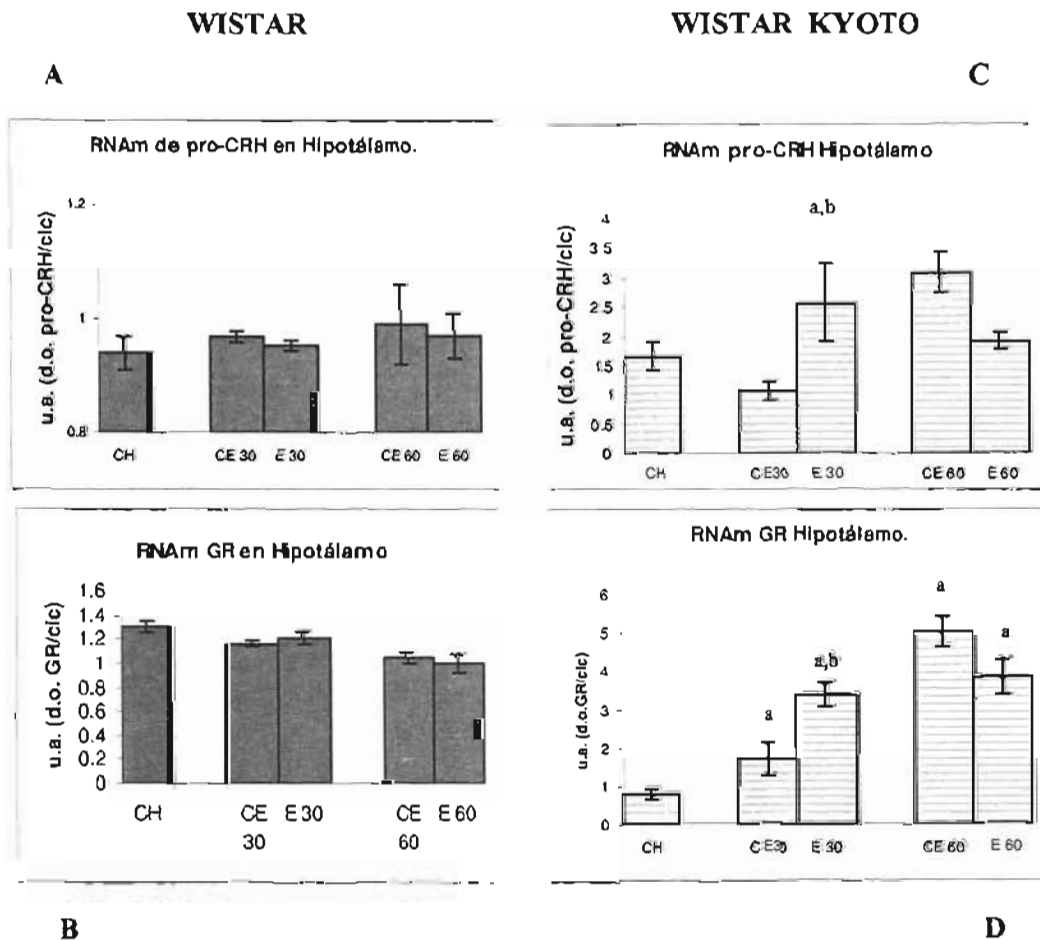


Gráfica 5. Contenido de Corticosterona sérica cepa Wistar Kyoto. Ratas sometidas a tres periodos de habituación y sacrificadas el 4º día (CH ó control de habituación); sometidas a 4 periodos de habituación y sacrificadas 30 ó 60 min después del último (CE 30 y CE 60 ó controles experimentales); habituadas durante 3 días y expuestas a la cámara con electrodo, sacrificadas 30 o 60 min después (E 30 y E 60 ó grupos experimentales). El ANOVA ($F_{4,25} = 4.665$ y $p = 0.008$) de dos vías y la prueba Post-Hoc de Fisher mostró que el grupo CH (1069.3 ± 97.5 ng/ml) es significativamente (*) diferente del resto.

Tabla 1. Valores (ng/ml de suero) del contenido de corticosterona en suero de las cepas Wistar y Wistar Kyoto. Se destaca el alto valor basal (CH) de la hormona en la cepa Wistar Kyoto respecto a la cepa Wistar.

GRUPO	Corticosterona Sérica (ng/ml)	
	WISTAR prom \pm E.S.M	WISTAR KYOTO prom \pm E.S.M
CH	530 \pm 55	1069.3 \pm 97.5
CE 30	649 \pm 68	575.62 \pm 94.5
E 30	883 \pm 118	688.5 \pm 66.7
CE 60	470 \pm 53	635.8 \pm 61.5
E 60	378 \pm 56	689.52 \pm 107.1

El panel D de la gráfica 6 -cepa WKY- muestra que el RNAm de GR del hipotálamo respondió tanto al estrés específico del modelo conductual como a la manipulación y cambio de ambiente al que estuvieron expuestas todas las ratas, es decir se observaron efectos inespecíficos al modelo de ansiedad. En primer lugar resulta evidente que el control habituado (CH) tiene el más bajo nivel de RNAm de GR y que esta diferencia es significativa (+) tanto con los grupos controles experimentales (CE 30 y CE 60) como con los experimentales (E 30 y E 60). En segundo lugar se observa que, a los 30 min existió un efecto específico del modelo conductual pues se detectó un aumento significativo en el RNAm de GR en el grupo experimental (E 30) respecto al control experimental de 30 minutos (CE 30). En los grupos de 60 min (CE 60 y E 60) se detectó un aumento en el RNAm de GR que fue independiente del protocolo experimental.



Gráfica 6. Análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-CRH y de GR en Hipotálamo-PVN de las cepas Wistar (A y B, respectivamente) y Wistar Kyoto (C y D, respectivamente). CH, control de habituación; CE 30 y CE 60 controles experimentales; E 30 y E 60 grupos experimentales. Unidades:

“u.a” unidades arbitrarias: densidad óptica de la banda correspondiente al cDNA de GR o CRH/cDNA CYC. A y B: sin diferencias significativas. C: El ANOVA ($F_{4,18} = 4.232$ y $p = 0.013$) de dos vías y la prueba Post-Hoc de Fisher mostró que el grupo E 30 (2.584 ± 0.679 d.o. cDNA pro-CRH/cDNACYC) era significativamente diferente de los grupos CH (a) (1.673 ± 0.252 d.o. cDNA pro-CRH/cDNACYC) y CE 30 (b) (1.070 ± 0.162 d.o. cDNA pro-CRH/cDNACYC). D: El ANOVA ($F_{4,16} = 14.612$ y $p < 0.0001$) de dos vías y la prueba Post-Hoc de Fisher mostró que CH era diferente al resto de los grupos (+) y que E 30 (3.416 ± 0.324 d.o. cDNA GR/cDNACYC) era diferente de CE 30.

5. TSH SÉRICA, CONTENIDO DE TRH, ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DEL RNAM DE PRO-TRH, TRH-R1 Y TRH-R2 EN EL HIPOTÁLAMO DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO.

A continuación se describen los resultados respecto al estado de actividad del eje Tiroideo y de la vía TRHérgica del hipotálamo (paneles A-H de la gráfica 7). Los paneles del lado izquierdo muestran los resultados obtenidos del estudio de la cepa Wistar (W) y los de la derecha los de la cepa Wistar Kyoto (WKY).

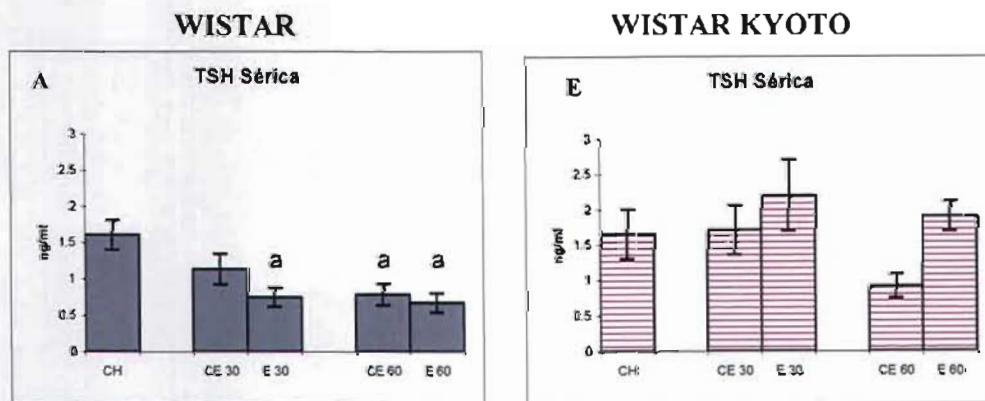
La TSH sérica de la cepa W no se modifica en respuesta al modelo de ansiedad (panel A) puesto que no existieron diferencias entre los grupos experimentales y sus controles (E y CE), pero la concentración de TSH de los grupos E 30, CE 60 y E 60 fue menor a la del grupo control de habituación (CH). En la cepa WKY (panel E) el ANOVA no señaló diferencias significativas aunque en el grupo experimental de 60 minutos se observó una tendencia hacia un aumento de TSH respecto a su control experimental.

Los paneles B y F ilustran el contenido de TRH en el hipotálamo medial superior, este corte como se mencionó en los métodos, contenía la mitad de la zona circundante al NPV y mitad de la región correspondiente a la EM. En la cepa W observamos un efecto inespecífico del modelo de ansiedad: el contenido de TRH aumentó en el grupo control experimental de 30 min (CE 30) mientras que los cuatro grupos restantes tienen una concentración de TRH equivalente. Al comparar el grupo CE 30 contra el experimental de 30 min (E 30), se observó una disminución en contenido de TRH en E 30, pero éste no difiere del control habituado. En la cepa WKY, también se observó un efecto inespecífico ya que por un lado, se detectó diferencia entre los grupos CE 30 y E 30 pero por otro lado, los grupos de 60 min no se distinguieron entre sí.

La cepa W (panel C) muestra un aumento significativo en el RNAm de pro-TRH sólo en el grupo experimental de 30 min (E 30), se considera un efecto específico ya que el

aumento es significativo con respecto a su control experimental y al control habituado. Éste es rápido y transitorio pues se detecta 30 minutos después de la prueba conductual y porque a los 60 min ya no se observa. En la cepa WKY (panel G) si bien se observa un aumento en el RNAm de pro-TRH en el grupo experimental de 30 min al compararlo con su control experimental, éste parece no ser específico del modelo ya que los grupos E 30 y CH no son distintos entre sí.

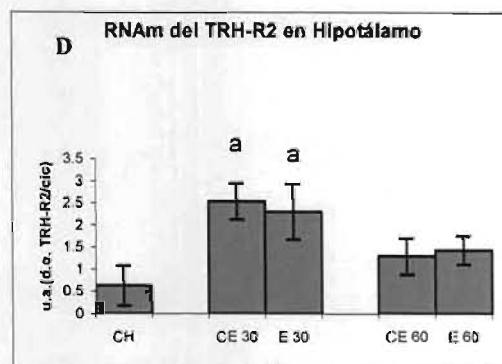
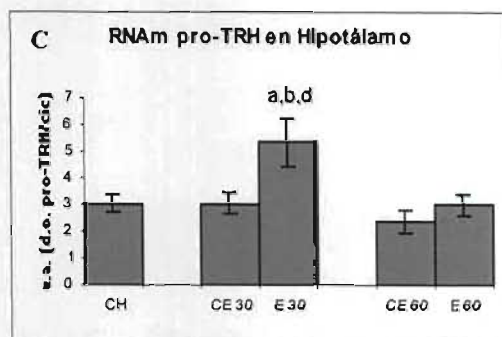
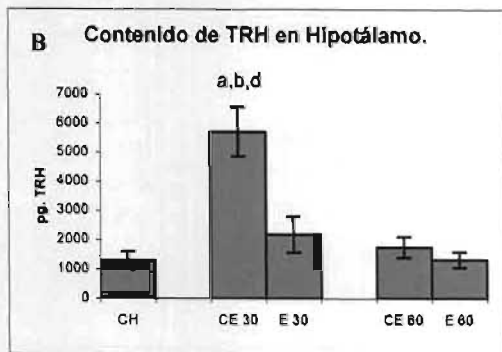
En cuanto al RNAm de los receptores a TRH, encontramos dos resultados importantes. El primero se ilustra en el panel H de la gráfica 7 en donde se observa que el RNAm del TRH-R1 en la cepa WKY aumentó en los dos grupos experimentales aunque sólo el grupo E 60 alcanzó significancia estadística. Este cambio fue específico y duradero pues los cambios se mantienen hasta 60 min post-prueba. No fue posible realizar la semicuantificación del RNAm del TRH-R1 en la cepa Wistar debido a que la cantidad de cDNA para la PCR no fue suficiente. Sí se analizó el RNAm del TRH-R2 (panel D) en la cepa W pero no se detectaron diferencias significativas. En la cepa WKY (panel I), se detectó una tendencia hacia la disminución en el RNAm de TRH-R2, en el grupo E 30 al comparar con el grupo control experimental pero no al hacerlo contra CH que fue el grupo que presentó mayor cantidad de RNAm del TRH-R1.



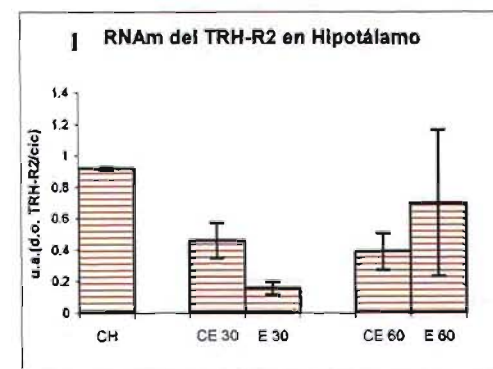
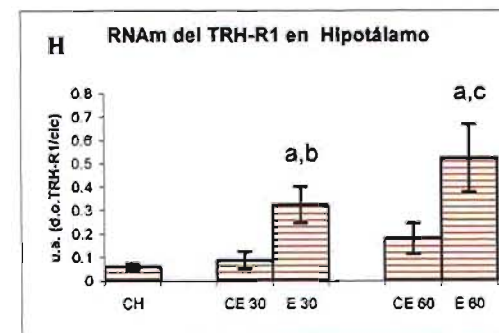
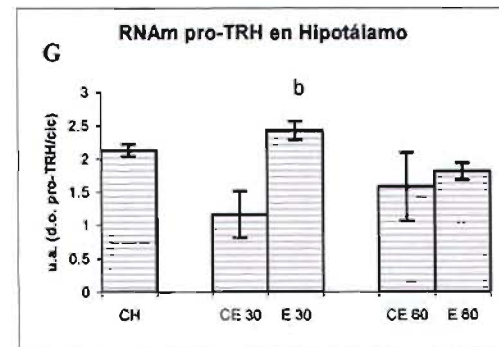
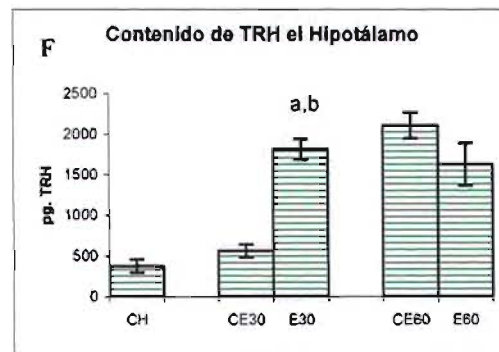
(Gráfica 7. continúa en la siguiente hoja)

Gráfica 7. Continuación.

WISTAR



WISTAR KYOTO



Gráfica 7. Cuantificación de TSH sérica (A y E), Contenido de TRH (B y F), Análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-TRH (C y G), de TRH-R1 (Wistar Kyoto H) y de TRH-R2 (D y H) en el Hipotálamo de las cepas Wistar (paneles izquierdos) y Wistar Kyoto (paneles derechos). CH, control de habituación; CE 30 y CE 60 controles experimentales; E 30 y E 60 grupos experimentales. En todos los experimentos se usaron ANOVAS de 1 vía y pruebas post-hoc de Fisher considerándose significativa con $p < 0.05$ A: ($F_{4,23} = 4.917$ y $p = 0.0052$) E 30, CE 60 y E 60 son diferentes de CH (a). B: ($F_{4,36} = 6.592$) mostró que CE 30 fue significativamente diferente de todos los grupos. F: $F_{21,713}$ el grupo E30 (E 30: 1805 ± 126 pg. TRH) fue significativamente * diferente de los grupos CE 30 (555 ± 81

pg. TRH) y CH (370 ± 81 pg. TRH). C: ($F_{4, 36} = 4.310$ y $p = 0.012$) E 30 (5.339 ± 0.894 d.o. cDNA TRH/cDNA CYC) fue significativamente diferente * de todos los grupos. G: ($F_{4, 24} = 2.747$ y $p = 0.0417$) CE 30 (1.158 ± 0.358 d.o. cDNA TRH/cDNACYC) fue significativamente diferente * de E 30 (2.420 ± 0.137 d.o. cDNA TRH/cDNACYC) y de CH (2.114 ± 0.155 d.o. cDNA TRH/cDNACYC). H: ($F_{4, 24} = 4.699$ y $p = 0.012$) E 60 (0.523 ± 0.146 d.o. cDNA TRH-R1/cDNACYC) fue significativamente * diferente todos los grupos controles (CE 60: 0.179 ± 0.066 d.o. cDNA TRH-R1/cDNACYC, CH: 0.060 ± 0.014 d.o. cDNA TRH-R1/cDNACYC y CE 30: 0.087 ± 0.073 d.o. cDNA TRH-R1/cDNACYC).

6. CONTENIDO DE TRH EN OTRAS REGIONES DEL SISTEMA LÍMBICO.

6.1 Hipocampo, Núcleo Accumbens y Septum.

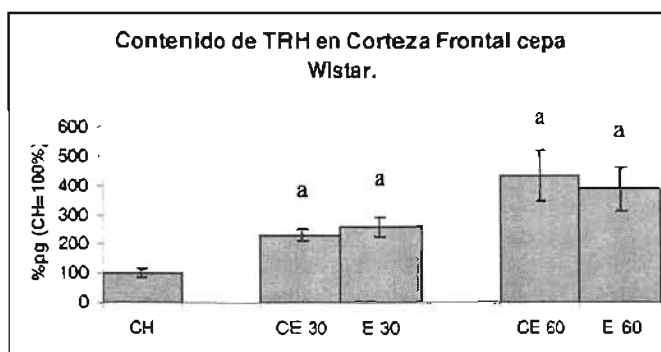
El contenido de TRH en estas tres regiones no varió durante el protocolo de ED. En el hipocampo detectamos en promedio un contenido de TRH en el grupo control habituado de 359 ± 67 pg y en el septum el promedio fue de 1529 ± 217 pg ambas regiones fueron analizadas en un experimento de cada cepa ($n = 40$ cepa W y 25 WKY). El núcleo accumbens presentó un promedio de 1216 ± 94 pg de TRH y fue cuantificado en dos experimentos de la cepa WKY ($n = 55$) y en uno para la cepa W ($n = 30$).

En el núcleo accumbens y en el hipocampo se realizó el análisis semicuantitativo del RNAm de pro-TRH en dos experimentos con la cepa Wistar ($n = 70$) y no se detectaron cambios significativos en ningún grupo.

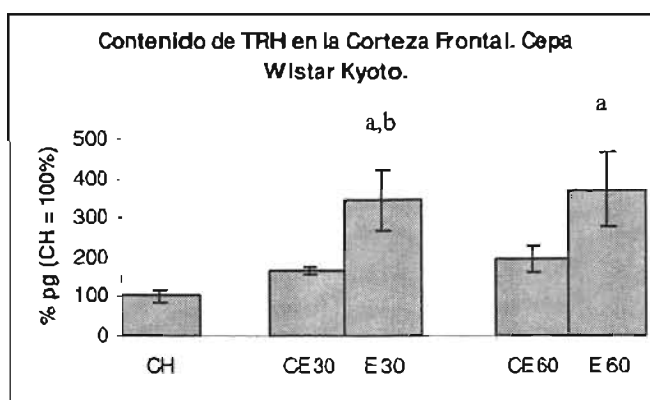
6.2 Corteza Frontal.

Las gráficas 8 y 9 muestran el promedio de dos experimentos ($n = 70$ cepa W y $n = 55$ cepa WKY), los valores están expresados en porcentaje de diferencia tomando al CH como el 100%. Encontramos diferencias significativas en el contenido de TRH en la Corteza Frontal entre las dos cepas: mientras que en la W el contenido de TRH aumentó en todos los grupos respecto al control habituado (CH), independientemente de si habían sido sometidos o no a los choques eléctricos, en la cepa WKY los efectos sí dependieron de la prueba conductual. En la gráfica 8 se ilustran los resultados obtenidos con la cepa W en la corteza frontal ($n = 70$). Se observó un aumento en el contenido de TRH inespecífico puesto que no hubo diferencias entre los grupos sometidos a las pruebas conductuales y los controles experimentales, pero sí de la condición experimental con el grupo CH.

La gráfica 9 muestra el contenido de TRH en la corteza frontal de la cepa WKY en los dos experimentos realizados con esta cepa (n = 55). Observamos que ambos grupos experimentales (E) presentaron aumento en el contenido de TRH al comparar tanto con sus respectivos controles experimentales (CE) como contra el control habituado (CH). Si bien sólo E 30 alcanzó significancia estadística. En esta cepa los efectos son específicos del protocolo de ED.



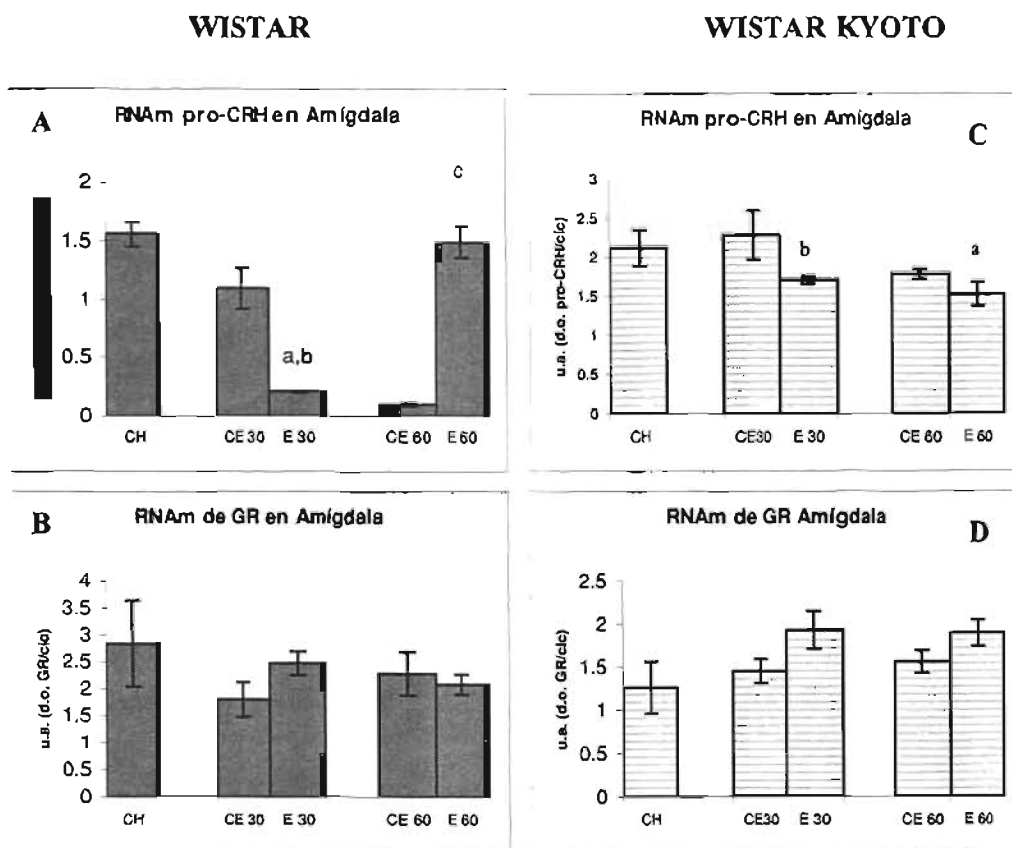
Gráfica 8. Contenido de TRH en la Corteza Frontal de la cepa Wistar Kyoto. CH, control de habituación; CE 30 y CE 60 controles experimentales; E 30 y E 60 grupos experimentales. Los resultados están expresados en porcentajes donde el 100% es el valor promedio CH. El ANOVA de un vía y la prueba post Hoc de Fisher ($F_{4,70} = 10.613$ y $p < 0.001$) mostraron que los grupos CE y E eran significativamente diferentes de CH (833 ± 78 pg). Se ilustra el promedio de dos experimentos.



Gráfica 9. Contenido de TRH en la Corteza Frontal de la cepa Wistar Kyoto. CH, control de habituación; CE 30 y CE 60 controles experimentales; E 30 y E 60 grupos experimentales. Los resultados están expresados en porcentajes donde el 100% es el valor promedio del control habituado. El ANOVA de una vía y la prueba post Hoc de Fisher ($F_{4,55} = 5.329$ y $p < 0.032$) mostraron que el grupo E 30 (4273 ± 349 pg) es significativamente diferente de CE 30 y de CH. Se ilustra el promedio de dos experimentos.

7. ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DEL RNAM DE PRO-CRH Y DE GR EN EL AMÍGDALA DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO.

En la cepa W, el RNAm de pro-CRH en la amígdala (gráfica 10) disminuyó significativamente en el grupo E 30 respecto al control experimental (CE 30) y al control habituado (CH) pero a los 60 min esto se revirtió, pues se observó un aumento en el grupo E 60 que fue significativo sólo respecto a su control experimental (panel A). En la cepa WKY ocurrió una disminución en el RNAm de pro-CRH en la amígdala en el grupo E 30 respecto a CE 30 y a CH y no se observaron cambios en el RNAm de pro-CRH en los grupos de 60 min (panel C). El RNAm de GR en la amígdala no cambio en ningún grupo de las dos cepas (paneles B y D).



Gráfica 10. Análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-CRH y de GR en la amígdala de las cepas Wistar (A y B, respectivamente) y Wistar Kyoto (C y D, respectivamente). CH, control de habituación; CE 30 y CE 60 controles experimentales; E 30 y E 60 grupos experimentales. Unidades: "u.a" unidades arbitrarias densidad óptica de la banda correspondiente al cDNA de GR o CRH/c DNA CYC. A: ($F_{4,17} = 18.925$ y $p < 0.001$) CE 30 (1.089 ± 0.189) es diferente de E 30 (0.204 ± 0.004) y CE 60 (0.95 ± 0.020) es diferente de E 60. (1.483 ± 0.135). C: ($F_{4,18} = 2.97$ y $p = 0.0387$) E 30 (1.707 ± 0.054) es diferente de CE 30 (2.284 ± 0.317) y CH (2.122 ± 0.26) es diferente de E 60 (1.525 ± 0.151). B y D: sin diferencias significativas.

8. CONTENIDO DE TRH, ANÁLISIS SEMI-CUANTITATIVO DEL RNAm DE PRO-TRH, TRH-R1 Y TRH-R2 EN EL AMÍGDALA DE LAS CEPAS WISTAR Y WISTAR KYOTO.

De las regiones que se analizaron, la amígdala fue la que presentó los cambios más consistentes entre las dos cepas tanto en el contenido de TRH y como en los niveles de RNAm. Para el contenido de TRH y el análisis semi-cuantitativo del RNAm se ilustran los resultados de dos experimentos ($n = 70$ en la cepa Wistar y $n = 55$ en la WKY) por lo que las unidades están expresadas en porcentaje de diferencia tomando al control habituado (CH) como el 100% (paneles superiores en la gráfica 11). El análisis de los RNAm de los dos receptores a TRH sólo se realizó en un experimento ($n = 30$ en cada cepa) que se ilustra en los cuatro paneles inferiores de la gráfica 11.

Tanto la cepa W como la WKY presentaron aumento en contenido de TRH en la amígdala pero éste fue detectado a diferentes tiempos post-prueba: en la cepa W ocurrió a los 60 min (panel A) y en la WKY a los 30 min (panel E). En la cepa W el aumento fue específico al modelo de ansiedad pues los tres grupos controles (CH, CE 30 y CE 60) tuvieron contenidos de TRH equivalentes mientras que en los dos grupos experimentales (E 30 y E 60) el contenido de péptido aumentó sin ser diferentes entre sí aunque sólo el grupo E 60 haya alcanzado niveles significativos. En la cepa WKY, el aumento de contenido TRH en el grupo E 30 es específico al protocolo conductual (los grupos CH y CE 30 tienen contenido de TRH equivalente) pero a los 60 min se observó un efecto inespecífico dado que también el grupo CE 60 tuvo una tendencia a aumentar el contenido de TRH respecto a CH.

El análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-TRH en la amígdala indicó una disminución significativa en la cepa W (panel B) que ocurrió de manera rápida (grupo de 30 min post-prueba), transitoria (a los 60 min post-prueba el grupo E 60 no es diferente de CE 60) y específica del modelo de ansiedad (CE 30 y CH son equivalentes pero E 30 es diferente de los dos). A los 60 min el E 60 disminuyó sólo respecto al control habituado (CH). En la cepa Wistar Kyoto (panel F) se observó una tendencia similar a lo observado con la cepa Wistar pero no hubo diferencias estadísticamente significativas.

El análisis semi-cuantitativo del RNAm de los receptores a TRH mostró diferencias entre cepas y dependiente del receptor analizado (TRH-R1 ó TRH-R2). Los paneles C y G ilustran el análisis del RNAm del TRH-R1 en la amígdala de las cepas W y WKY, respectivamente: en la cepa W se observó que los dos grupos de 30 min (CE 30 y E 30)

y los dos de 60 min (CE 60 y E 60) presentaron tendencia a aumentar el RNAm de TRH-R1 al compararlos con el control habituado (CH) que presentó los niveles más bajos pero, debido a la gran variación intragrupal, las diferencias que se observaron no fueron estadísticamente significativas. En la cepa WKY ocurrió un aumento en los 2 grupos de 30 min y una disminución en los de 60 min. La manipulación y el cambio de ambiente causaron este efecto y no los choques eléctricos (ya que no hay diferencias entre los grupos E y los CE) pero estas diferencias tampoco fueron estadísticamente relevantes.

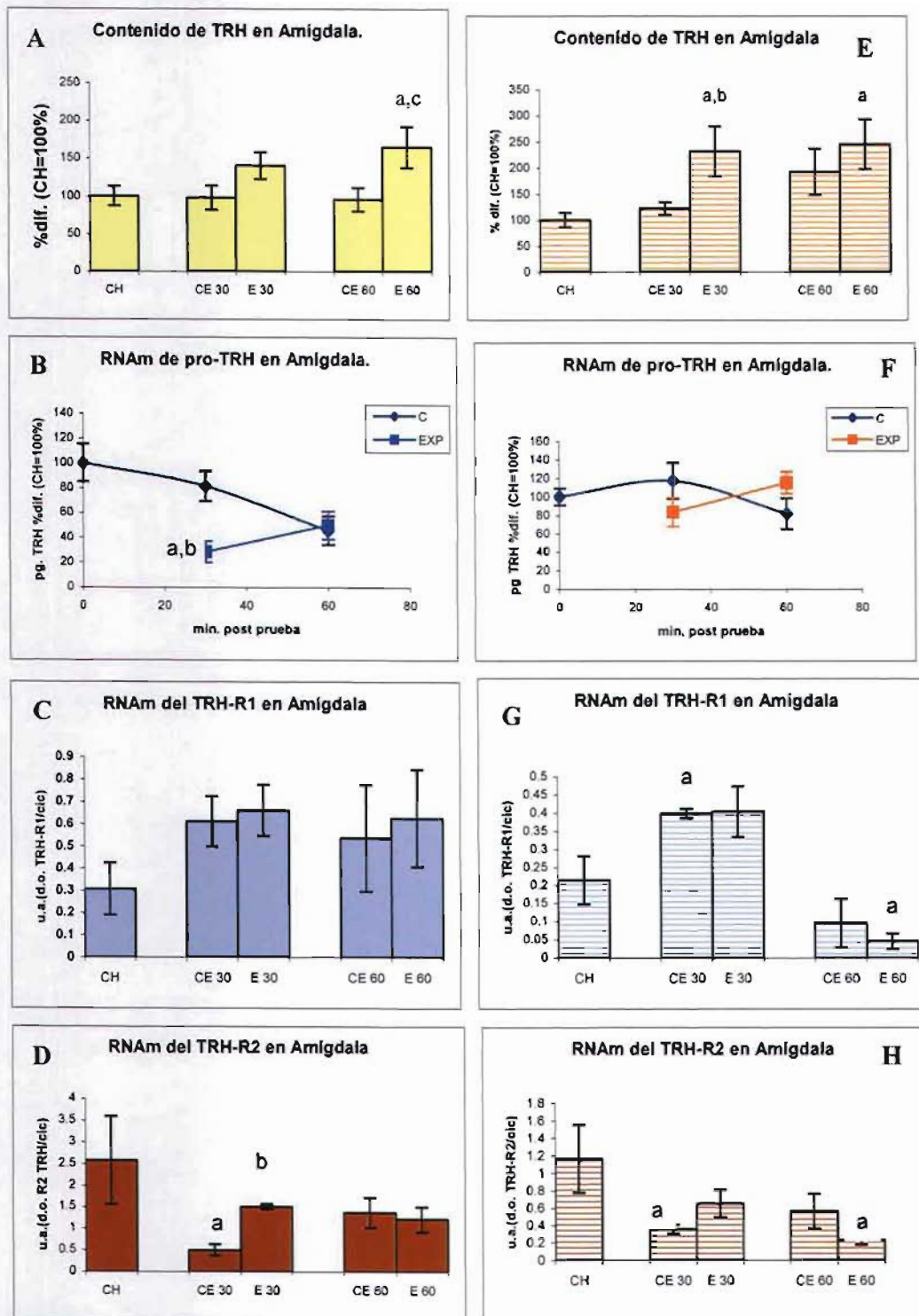
En cuanto al TRH-R2, los cambios que observamos en el RNAm en la cepa W (panel D) fueron específicos al modelo conductual pero sólo a los 30 min ya que se observan diferencias significativas entre el grupo CE 30 y el E 30. Sin embargo, también puede identificarse un efecto inespecífico al comparar los niveles de RNAm del TRH-R2 del grupo control habituado (CH) que fueron altos, con los del grupo CE 30 en donde la diferencia también es significativa. En la cepa WKY se observó la misma tendencia pero no fue estadísticamente significativa. En los grupos de 60 min de ambas cepas no se detectaron cambios entre experimental y control experimental pero en la cepa WKY, el grupo E 60 fue significativamente distinto del grupo CH.

9. PARÁMETROS CONDUCTUALES: PARADIGMA B.

En esta última sección se describen los efectos en el comportamiento de ratas W que fueron inyectadas i.c.v. (ventrículo lateral) con una solución de TRH. Se compara el comportamiento de las ratas inyectadas con solución salina contra el del grupo de ratas inyectadas con la solución 34.5nM de TRH. Se analizaron 5 ratas inyectadas con solución salina debido a fallas en la grabación del modelo de ansiedad y 6 ratas inyectadas con la solución de TRH.

WISTAR

WISTAR KYOTO



Gráfica II. Contenido de TRH en Amígdala (A y E), Análisis Semi-cuantitativo del RNAm de pro-TRH en Hipotálamo (B y F), de TRH-R1 (C y G) y de TRH-R2 (D y H) de las cepas Wistar Y Wistar Kyoto. CH, control de habituación; CE 30 y CE 60 controles experimentales; E 30 y E 60 grupos experimentales. En todos los experimentos se usaron ANOVAS de 1 vía y pruebas post-hoc de Fisher. A: $F_{4,65} = 2.999$ y $p = 0.0308$ E 60 ($165 \pm 26\%$) es diferente de CH y de CE 60. E: $F_{4,53} = 3.132$ y $p = 0.0242$ E 30 ($232 \pm 43\%$) es diferente de CH y de CE 30. B y F valores en porcentaje de diferencia donde

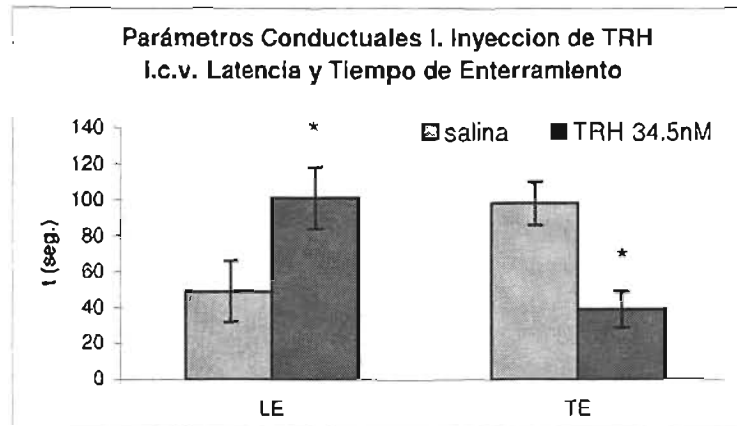
el 100% corresponde al valor promedio obtenido en el grupo control habituado (CH). Línea azul, grupos controles experimentales (CE 30 y CE 60), línea rosa grupos experimentales (E 30 y E 60). En B E 30 es diferente de CE 30 y de CH. $D F_{4, 30} = 3.581$ y $p = 0.0383$ CE 30 (0.494 ± 0.131) es diferente de E 30 (1.508 ± 0.064) y de CH (2.570 ± 1) H: $F_{4, 28} = 1.768$ y $p = 0.0318$ CH (1.162 ± 0.386) es diferente de E 60 (0.232 ± 0.063).

En la gráfica 12 se observa que las ratas inyectadas con la solución de TRH invirtieron menor tiempo en enterrar el electrodo que las ratas inyectadas con salina (panel A: 39 ± 10 seg vs 98 ± 12 seg). El grupo de TRH tuvo mayor tiempo de latencia al enterramiento en comparación con el grupo tratado con solución salina (panel B), (101 ± 17 vs 49 ± 17). La conducta exploratoria (Panel B: EA, 20 ± 1 en ambos grupos) y la cantidad de choques recibidos (Panel C: 5 ± 0.4 del grupo TRH vs 6 ± 1 del grupo SAL) no se vieron modificados por el tratamiento. La inyección de TRH modificó el parámetro conductual relacionado a la ansiedad (TE) y no modificó parámetros de actividad o motilidad general medido por las exploraciones al aire (EA).

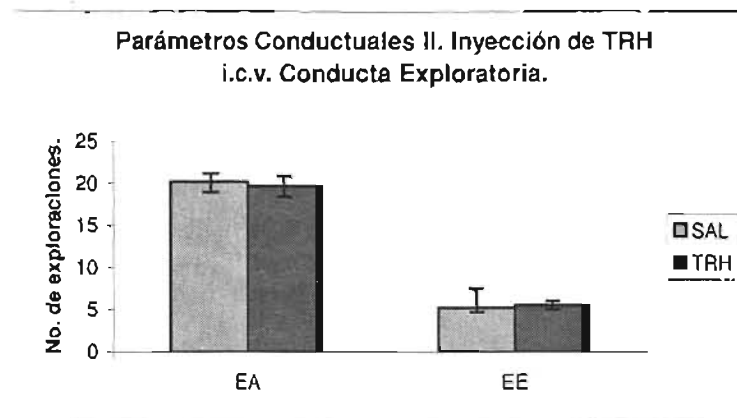
10. TSH SÉRICA EN EL PARADIGMA B.

En el experimento de inyección de TRH se cuantificó la TSH en suero de los tres grupos (CI, SAL y TRH) y se encontró que el grupo intacto (CI: 3.036 ± 0.417 ng/ml) tenía mayor concentración de TSH que los grupos SAL y TRH sin que hubiera diferencia entre estos dos últimos (SAL: 1.612 ± 0.156 ng/ml; TRH: 1.7 ± 0.179 ng/ml) por lo que el tratamiento con TRH no provocó aumento en la Tirotropina sérica (gráfica 13)..

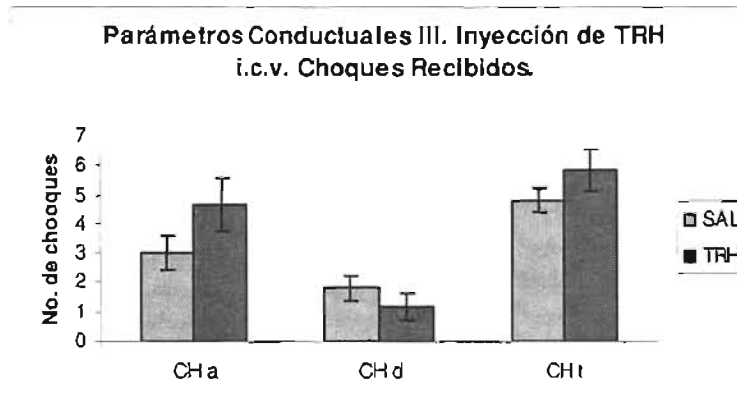
A



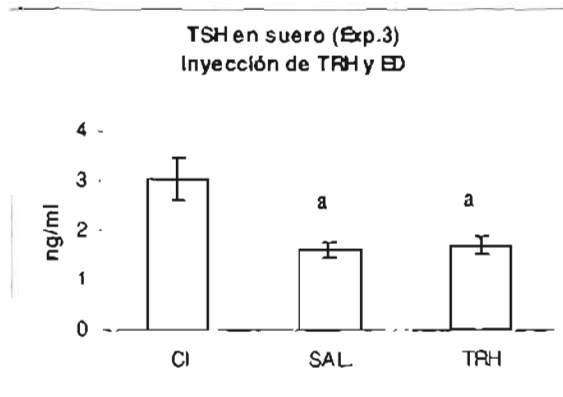
B



C



Gráfica 12. Parámetros conductuales en el experimento de Inyección i.c.v de TRH y ED. SAL: inyectados con solución salina (n = 5) y TRH: inyectados con solución con 34.5nM de TRH n = 6. A. LA: latencia al enterramiento y TE: tiempo de Enterramiento. La prueba de t-Student mostró que el grupo inyectado con solución 34.5nM de TRH tuvo un TE significativamente (*) menor (39 ± 10 seg.) que el grupo inyectado con solución salina (98 ± 12 seg.). Las diferencias en LE no son significativas (TRH: 172 ± 86 seg y Sal. 49.2 ± 17 seg.). B y C sin diferencias significativas.



Gráfica 13. Contenido de TSH en suero experimento de Inyección i.c.v. de TRH y ED. Grupo control intacto (CI, n = 5) y experimentales (SAL: inyectados con solución salina y TRH: inyectados con solución 34.5nM de TRH). El ANOVA ($F_{2,19} = 9.471$ y $p = 0.0019$) mostró que los dos grupos experimentales (SAL: 1.612 ± 0.156 ng/ml y TRH: 1.7 ± 0.179 ng/ml) fueron significativamente diferentes de el grupo CI (3.036 ± 0.417 ng/ml), sin haber diferencias entre SAL y TRH.

VII. DISCUSION.

1. CONDUCTA Y EJE HHA

En este trabajo se muestra que las conductas de la cepa Wistar y de la Wistar Kyoto en modelo de ansiedad de enterramiento difieren en la sensibilidad de percibir estímulos aversivos y en el tipo de respuesta ante ellos. Se ha demostrado que la cepa Wistar Kyoto es más sensible al estrés [Paré, 1990; Paré y Redei, 1993; Paré 1994]; en nuestro trabajo esto se reflejó en que el número de choques eléctricos que provocaron una respuesta conductual fue menor en la cepa WKY con respecto a la W. Las respuestas conductuales de la cepa WKY ante el estrés son más severas en comparación con la cepa W [Redei et al, 2001; Solberg, 2001]; en el modelo de ED mostramos que la conducta de la cepa Wistar Kyoto se orientó hacia evitar contactos con el electrodo una vez que habían recibido un choque, evidenciando un mayor grado de miedo (tuvo menos aproximaciones al electrodo) a recibir nuevos estímulos aversivos mientras que las ratas W, aún habiendo identificado al electrodo como la fuente aversiva, se aproximaron a él en repetidas ocasiones. La cepa W enterró por más tiempo el electrodo en comparación con el empleado por la cepa WKY en esta conducta lo que indica un comportamiento activo de defensa ante el choque eléctrico que no se observó en la cepa WKY que tendió a emplear una conducta de evitación. Este trabajo reprodujo las diferencias conductuales reportadas para las cepas Wistar y Wistar Kyoto en el modelo de enterramiento defensivo [Paré, 1994 y Paré 1992].

Fisiológicamente, se ha propuesto que las respuestas conductuales al estrés que presenta la cepa WKY son, en parte, el resultado de: 1) un eje adrenal con umbral de activación bajo [López-Ruvalcaba y Lucki, 2000], y 2) falta de regulación negativa sobre el eje adrenal que provoca concentraciones altas y perdurables de corticosterona y ACTH y que mantienen un estado de ansiedad [Rittenhouse et al., 2002]. En nuestros experimentos, mostramos que la cepa WKY desplegó la conducta de enterramiento defensivo después de haber recibido pocos estímulos aversivos, lo que apoya la hipótesis de que el umbral de activación del eje HHA es bajo en esta cepa. Por otro lado, en este experimento sólo detectamos aumento en la corticosterona sérica en la cepa W en el modelo conductual. En la cepa WKY la secreción de corticosterona, como respuesta al modelo de ansiedad, no se observó probablemente debido al alto nivel basal

(i.e. del grupo CH) de esta hormona, que impidió una reacción del eje adrenal ante el estrés puesto que éste ya se encontraba activado. Sin embargo en estos experimentos, otros marcadores de la actividad del eje HPA sí fueron regulados positivamente en la cepa WKY, tal es el caso del RNAm de pro-CRH y el RNAm del receptor GR en el hipotálamo. En este sentido, estos resultados reproducen lo que se ha observado en el experimentos de estrés psicológico por inmovilización en donde el RNAm de CRH en el hipotálamo aumenta así como los índices de ansiedad [Nomura et al, 2003; Makino et al., 2002]. También concuerdan con reportes en los que la inhibición de la señalización CRHérgica, por medio del uso de antagonistas a CRH inyectados i.c.v., en el modelo de ED atenúan las respuestas ansiosas [Koob et al., 1994 y Basso et al., 1999].

2. EJE HHT Y LA VÍA TRHÉRGICA HIPOTÁLAMICA

Nuestros resultados indican que el eje HHT no se activó en el modelo de ansiedad de ED ya que no se observaron diferencias en el contenido de tirotropina en las ratas sometidas al protocolo experimental en ninguna de las dos cepas. Además, el contenido de TRH en la eminencia media no varió en el modelo de ED.

En casos de individuos recientemente expuestos a un estrés traumático, se ha descrito coincidencia de hiperactividad de la glándula tiroidea con síntomas neuropsiquiátricos de ansiedad como palpitaciones, dificultades para respirar y frecuencia cardiaca acelerada. Aunque las observaciones clínicas que relacionan el estrés, síntomas psiquiátricos y enfermedades de la tiroides han continuado, a la fecha no se han realizado estudios epidemiológicos que establezcan la relación entre estas patologías. Las hormonas tiroideas desempeñan gran variedad de funciones dentro de las que se encuentra la utilización de energía en las células (que es de gran importancia en durante el estrés) y se ha demostrado que el estrés causa aumento en las hormonas tiroideas a largo plazo [Mason et al 1968]. En algunos casos de trastornos de ansiedad se han reportado niveles altos de la hormona tiroidea T3 [Mason 1994] y en algunos pacientes clínicamente ansiosos existe secreción aumentada de TSH en respuesta a la estimulación por TRH [Moreau et al, 1998 y Tukul et al., 1999]. Sin embargo los resultados no han sido concordantes con otros estudios [Konig et al 1998; Kavoussi et al

1993, Fossey et al 1993, Uhde et al 1992], por lo que el papel del eje HHT en los trastornos emocionales como la ansiedad no ha sido establecido. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la conducta de ansiedad en el modelo de ED no está relacionada con la activación del eje HHT.

Aunque el TRH hipofisiotrópico parece no estar regulado en la conducta de ansiedad, otros marcadores de la vía TRHérgica hipotalámica sí respondieron específicamente al protocolo conductual: el contenido de TRH y el RNAm de pro-TRH aumentaron en el hipotálamo medial superior en ambas cepas y la expresión del TRH-R1 de la cepa WKY aumentó también en esta región. Estos resultados permiten inferir un papel del TRH hipotalámico en el modelo de ansiedad pero no como activador neuroendócrino del eje HHT, que es la función primordial que se le ha asignado al TRH hipotalámico [Boler *et al.*, 1969], sino probablemente como un neuromodulador. Los núcleos del hipotálamo que sintetizan TRH y que están siendo activados en respuesta a la estimulación del choque eléctrico en este modelo, deberán ser identificados.

En el hipotálamo medial superior de la cepa Wistar Kyoto puede ocurrir una regulación positiva del receptor TRH-R1 por disminución de ligando, efecto que ha sido reportado en experimentos de depleción de TRH endógeno por lesión [Sharif et al, 1983] o por tratamiento crónico con drogas [Lason et al, 1995].

Nuestros resultados aportan evidencias que indican la participación de vías TRHérgicas no hipofisiotrópicas pero sí hipotalámicas en el modelo de ansiedad de enterramiento defensivo, pero no responden preguntas sobre cómo ocurre esta participación. Es necesario indagar en detalle las relaciones del TRH en el hipotálamo con otros neurotransmisores de relevancia durante la ansiedad, como la noradrenalina y el GABA. Se ha reportado por ejemplo, que el TRH es capaz de estimular la liberación de NA en la corteza [Itoh et al, 1994] y que en el cerebelo estimula corrientes de calcio dependientes de GABA [Imamura et al, 1999], pero poco se sabe sobre el estado de activación del TRH y su interacción con otros neurotransmisores en modelos conductuales de estrés.

3. EL CRH EN LA AMÍGDALA

El estrés, incluyendo la inyección central (i.c.v.) de CRH, induce la activación de *c-fos* en la amígdala [Arnold et al., 1992, Honkaniemi, 1992, Honkaniemi et al., 1992, Imaki et al., 1993] y aumenta el RNAm de CRH [Swanson y Simmons, 1989; Mamalaki et al., 1992; Makino et al., 1994a y b, 1995]. Además, después de estrés por inmovilización, ocurre liberación de CRH en la amígdala. Similar a los efectos intracerebroventriculares del CRH, se ha reportado que la infusión intra-amigdalina de CRH produce comportamiento ansiogénico [Liang y Lee, 1988, Lee y Tsai, 1989, Elkabir et al., 1990] y la infusión de antagonistas a CRH atenúa significativamente los efectos ansiogénicos del alcohol durante el síndrome de abstinencia [Heinrichs et al, 1992, Swiergiel et al., 1993].

Nuestros resultados reproducen el aumento en el RNAm de CRH en la amígdala reportado en otros modelos, pero sólo en la cepa Wistar y en el grupo de 60 min. Sin embargo, este efecto es inespecífico pues el aumento en RNAm de pro-CRH se debe a una disminución en el grupo control (CE 60) respecto al control habituado más que a un efecto sobre el grupo experimental exclusivamente. En la amígdala de la cepa Wistar Kyoto no observamos aumento en el RNAm de pro-CRH. Puede ser que el modelo de ansiedad de enterramiento defensivo no represente un estrés tan fuerte como el de inmovilización, en el que se ha demostrado estimulación de la síntesis de CRH y que por lo tanto, en nuestros resultados sólo se observe un leve aumento en el RNAm de CRH en la amígdala. Se sabe que diferentes tipos de estrés producen cambios moleculares distintos y además que éstos también dependen de la duración y del número de eventos del estímulo [Makino et al 1994 a y b]

Se ha observado que la inyección sistémica de corticosterona tanto crónica como aguda, provoca aumento en la expresión de CRH en el núcleo central de la amígdala [Makino et al 1994a]. Durante el estrés, que estimula la secreción de sistémica glucocorticoides, también se observa aumento en la síntesis de CRH en la amígdala. Pero en nuestros experimentos sólo se observó un aumento moderado en la corticosterona sérica en la cepa W mientras que en la cepa WKY no hubo aumento en los grupos experimentales. En este trabajo, el patrón de secreción de corticosterona de la cepa W apoya la hipótesis de que este modelo representa un estrés leve y en el caso de la cepa WKY, la

hiperactividad previa del eje adrenal impidió una respuesta fisiológica al estrés del modelo. Estos fenómenos pueden explicar que la síntesis de CRH en la amígdala no aumentó, en parte, debido a la ausencia del estímulo de los glucocorticoides sobre las neuronas de CRH en la amígdala. Aunque, por otro lado, no podemos descartar que el tipo de disección haya evitado observar los cambios en núcleos específicos de la amígdala.

4. EL TRH EN LA AMÍGDALA

La vía TRHérgica de la amígdala respondió al modelo de ansiedad de manera específica en las dos cepas. El análisis de los diversos marcadores de esta vía en la amígdala indicó que ésta puede estar inhibida ya que el contenido de TRH aumentó mientras que el RNAm de pro-TRH disminuyó en grupos experimentales. Proponemos que el TRH de la amígdala no está siendo liberado lo que puede contribuir al establecimiento de un estado de tipo ansioso en las ratas. Nuestros resultados no concuerdan con un reporte en el que la inyección bilateral intra-amigdalara de TRH en el núcleo central de la amígdala agrava los efectos del estrés por inmovilización y frío en la formación de úlceras gástricas en ratas [Ray et al 1990]. Esta discrepancia puede deberse a que en nuestro trabajo, el modelo animal empleado no representa un estrés metabólico para el animal, mientras que en el modelo de inmovilización por frío sí por lo que los sistemas TRHérgicos son modulados de distinta manera.

Mientras que el TRH-R1 de la amígdala no pareció responder a la prueba conductual, el TRH-R2 sí lo hizo, en particular en la cepa Wistar donde aumentó significativamente en el grupo E 30. En la cepa Wistar Kyoto también se observó esta tendencia en el grupo E30. La concentración del RNAm del TRH-R2 en la amígdala es baja (Heuer et al 2000] en comparación con la del TRH-R1 y se ha propuesto que estos receptores llevan a cabo funciones distintas: el R1 principalmente transduce señales neuroendócrinas mientras que el R2 es propuesto como mediador de respuestas cognitivas y somato-sensoriales [Gershengorn et al 2003]. No se ha medido la expresión del RNAm de TRH-R2 durante eventos estresantes pero, nuestros resultados apuntan hacia su participación en el modelo de ansiedad. Pareciera que ocurrió una regulación positiva en la expresión del TRH-R2 debida a la disminución en la liberación de TRH en la amígdala. Es

intrigante que el grupo CH presentó niveles altos en el RNAm del TRH-R2 en ambas cepas, lo que sugiere que este receptor no sólo es modulado durante la ansiedad sino que también pueda ser afectado por otros factores como el ambiente y la manipulación.

La amígdala es probablemente la estructura más implicada en el procesamiento emocional. [Cardinal et al 2002]. Desde que se demostró que las lesiones amigdalinas en primates provocaban anulación de respuestas de miedo (síndrome de Kluver y Bucy) esta estructura ha sido reconocida como un elemento clave en las bases neurales de las emociones. Estudios electrofisiológicos han mostrado que al estimular la amígdala se producen cambios en los patrones del comportamiento que son parecidos a los que se producen por la presencia de estímulos aversivos y lesiones en la amígdala bloquean reacciones al estrés innatas o condicionadas [David y Casell 1994]. Este trabajo es el primero en mostrar que, en la amígdala, la vía TRHérgica endógena es modulada durante un modelo animal de ansiedad.

5. TRH EN CORTEZA FRONTAL, HIPOCAMPO Y NÚCLEO ACCUMBENS

5.1 Núcleo Accumbens, Hipocampo y Septum

EL TRH en el núcleo accumbens ha sido postulado como un activador en la motilidad por medio de la activación de vías dopaminérgicas [Kalivas et al 1987 y Miyamoto et al, 1987]. Nuestros resultados indican que la vía TRHérgica en el núcleo accumbens no es modulada durante el modelo de ED por lo que la conducta de ansiedad no está relacionada con la vía del TRH del núcleo accumbens ni con sus interacciones con la dopamina en esta región.

Tampoco observamos cambios en el metabolismo del TRH debidos al modelo conductual en el septum ni en el hipocampo. Pese a que la participación de estas dos regiones en la conducta de enterramiento defensivo ha sido bien caracterizada [Treit et al, 2001], ésta parece no involucrar neuronas de TRH. En el hipocampo, se ha propuesto la participación del TRH en modelos de memoria y aprendizaje [Ballard et al., 1996] y se ha comprobado activación esta vía TRHérgica durante el kindling amigdalino [de Gortari et al., 1998], nuestros resultados indican activación inespecífica del TRH en esta región pues observamos una disminución en el contenido de TRH en la cepa W y una tendencia al aumento en el RNAm que dependieron más de la manipulación que del

modelo conductual en sí. En conjunto estos experimentos demuestran que el TRH extra-hipotalámico es regulado de manera región-dependiente y en función también del tipo de conducta que se estudie.

5.2 Corteza frontal

En esta región, el contenido de TRH aumentó inespecíficamente en la cepa W y en los grupos experimentales exclusivamente en la WKY. No se ha reportado que durante eventos estresantes exista una activación de las neuronas TRHérgicas en la corteza frontal, pero sí se ha demostrado que el TRH produce liberación de NA en esta región [Itoh et al 1994]. Con los resultados obtenidos en este trabajo, sólo es posible especular que el aumento de TRH en las ratas de la cepa Wistar Kyoto expuestas al modelo de ansiedad está relacionado con el comportamiento ansiogénico de esta cepa y que la NA puede ser uno de los efectores del tripéptido en esta región.

Como la cepa W presentó aumento en contenido de TRH tanto en los grupos estimulados por los choques eléctricos como en los controles, por lo tanto inferimos su participación en eventos de exploración al ambiente y en respuesta a la manipulación pero no debido al estímulo aversivo de los choques eléctricos. Dado que en esta región no se detecta RNAm de TRH, es necesario indagar sobre el estado de activación de otros marcadores de la vía TRHérgica (receptores, PPII) en las mismas condiciones experimentales para poder establecer si ésta es modulada en función de la cepa que se investigue y/o del modelo conductual que se utilice.

En resumen, en el modelo de ED observamos participación del TRH límbico y no del hipofisiotrópico en la conducta de ansiedad. Nuestros resultados indicaron que sólo las vías TRHérgicas del sistema límbico y probablemente, de la amígdala exclusivamente, son moduladas al someter a los animales a un paradigma conductual.

6. EFECTOS DE LA INYECCIÓN I.C.V. DE TRH EN LA CONDUCTA DE ENTERRAMIENTO DEFENSIVO

Nuestros resultados indican que el TRH puede tener efectos ansiolíticos ya que la inyección de TRH i.c.v disminuyó el tiempo de enterramiento y el tiempo requerido

para reaccionar activamente ante los choques eléctricos. En otro trabajo en el que fue utilizado el modelo de sobresalto acústico [Thomson y Rosen, 2001] se observa que el TRH disminuye la respuesta a dicho estímulo. Sin embargo, la inyección de TRH no modifica el sobresalto por miedo y además causa aumento en la motilidad durante las pruebas conductuales por lo que los autores no pueden descartar efectos inespecíficos. En contraste, en nuestro trabajo, el efecto ansiolítico del TRH exógeno no se debió a una disminución en la actividad de las ratas puesto que el marcador conductual de actividad no fue modificado (i.e. las exploraciones al aire). Dado que tampoco se modificó el número de estímulos necesarios para provocar una respuesta defensiva de enterramiento, la disminución en la conducta ansiosa no se debió a que las ratas recibieran menos choques. Este es el primer reporte en el que, por medio de inyección central de TRH se observan disminuciones en conductas emocionales exclusivamente.

Adicionalmente, los efectos conductuales de la inyección de TRH no involucraron activación del eje tiroideo pues no encontramos aumento de tirotropina en las ratas tratadas con TRH. Este resultado concuerda con los experimentos de ED con ratas intactas en los que tampoco encontramos activación del eje tiroideo y además apoya nuestra hipótesis de que un sitio de actividad ansiolítica del TRH puede ser la amígdala.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las diferencias conductuales en el modelo de enterramiento defensivo de las cepas Wistar y Wistar Kyoto se deben al diferente grado de activación del eje adrenal y posiblemente, a la activación y regulación diferenciales de la vía TRHérgica hipotalámica.
2. El TRH del hipotálamo, pero no el hipofisiotrópico, participa en la conducta de ansiedad.
3. En ambas cepas existe una inhibición de la vía de TRH de la amígdala que correlaciona con la conducta ansiosa.
4. Los cambios en la vía del TRH de la amígdala apoyan su participación en conductas relacionadas con procesos emotivos, pues la expresión del receptor TRH-R2, aumenta en esta región.
5. El efecto ansiolítico de la inyección de TRH i.c.v. confirma que el péptido tiene una función determinante en la conducta de los animales sometidos al modelo de enterramiento defensivo y apoya que los cambios endógenos de la vía de TRH que describimos aquí, están relacionados con su participación en la ansiedad y son independientes de la función neuroendócrina.

IX. REFERENCIAS.

1. Arancibia S., Tapia-Arancibia L., Assenmacher I y Astier H., 1983. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology*. 37: 225-228.
2. Arborelius L., Owens M.J., Plotsky P.M. y Nemeroff C.B. 1999. The role of corticotrophin-releasing factor in depression and anxiety. *Journal of Endocrinology*. 160, 1-12.
3. Arnold F.J.L., Bueno M.D., Shiers H., Hancock D.C., Evan G.I. y Herbert J. 1992. Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotrophin-releasing-factor in unstressed or stressed male rats. *Neuroscience* 51, 377-390.
4. Arnold R., Klingberg F., Schaker W., 1991. Systemically applied thyrotropin-releasing hormone (TRH) modifies spontaneous behaviour of rats. *Biomed Biochim Acta*. 50, 1217-1224.
5. Ballard T.M., Hunter A.J. y Bennett G.W. 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*. 127 : 265-275
6. Bard, P. A diencephalic mechanism for the expression of rage with special reference to the central nervous system. *Am. J. Physiol.* 84, 490-513 (1928). *Psychopharmacology*. 145: 21-30.
7. Basso A.M., Spina M., Rivier J., Vale W. y Koob GF. 1999. Corticotropin-releasing factor antagonist attenuates the "anxiogenic-like" effect in the defensive burying paradigm but not in the elevated plus-maze following chronic cocaine in rats.
8. Bauer K., 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie*. 70, 69-74.
9. Bhargava H.N., Matwyshyn G.A. 1980. Influence of the thyrotropin-releasing-hormone and hystidyl-proline diketopiperazine on spontaneous locomotor activity and analgesia induced by delta 9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *European Journal of Pharmacology*. 68: 147-154.
10. Boler J., Enzmann F., Folkers K., Bowers C.Y., Schally A.V., 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun*. 377, 5-10.
11. Breese D.R., Cott J.M., Cooper B.R., Prange A.J., Lipton M.A.. 1974. Antagonism of ethanol narcosis by thyrotropin-releasing-hormone. *Life Sciences*. 14: 1053-1063.
12. Burgus R., Dunn T.F., Desiderio D., Guillemin R., 1969. Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the [PCA-His-Pro-NH₂ sequence]. *C R Acad Sci Hebd Sciences Acad Sci D*. 269, 1870-1873.
13. Calza L, Giardino L, Ceccatelli S, Zanni M, Elde R, Hökfelt T 1992 Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 51:891-909
14. Cannon, W. B. The James-Lange theory of emotions: acritical examination and an alternative theory. *American Journal of Psychology*. 39, 106-124 (1927).
15. Cao, J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lembo P., Ahmad S., y Walker P., 1998 Cloning and Characterization of a cDNA Encoding a Novel Subtype of Rat Thyrotropin-releasing Hormone Receptor *The Journal of Biological Chemistry*. 273;48, 27, pp. 32281-32287.
16. Cardinali D.P., Gvozdenovich E., Kaplan M.R., Fainstein I., Shifis H.A., Pérez-Lloret S., Albornoz L., Negri A. 2002 A double-blind placebo-controlled study on melatonin efficacy to reduce anxiolytic benzodiazepine use in the elderly. *Neuroendocrinology Letters*. 23: 55-60.
17. Charli J.L., Vargas M.A., Cisneros M., de Gortari P., Baeza M.A., Jasso P., Bourdais J., Perez L., Uribe R.M. y Joseph-Bravo P. 1998. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6(1), 45-57.

18. Charli J.L., Vargas M.A., Joseph-Bravo P., 1994. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology*. 60, 323-330.
19. Chomczynski P., Sacchi N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162, 156-159.
20. Clement Y., Chapouthier, G., 1998. Biological Bases of Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 22, 623-633.
21. Curran T, Rauscher FJ 3rd, Cohen DR y Franza BR Jr 1988. Beyond the second messenger: oncogenes and transcription factors. *Cold Spring Harbour Symposium of Quantitative Biology* 53 769-777.
22. de Gortari P, Joseph-Bravo P, Monroy-Ruiz J, Martinez A, Cisneros M, Fernandez Guardiola A. 1998 Brain thyrotropin-releasing hormone content varies through amygdaloid kindling development according to afterdischarge frequency and propagation. *Epilepsia*. 39, 897-903.
23. de Gortari P., Fernández Guardiola A., Cisneros M., Martínez A., Joseph-Bravo P., 1995. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II during the development of amygdaloid kindling. *Brain Research*. 679, 144-155.
24. de Gortari P., González-Alzati, M.E., Cisneros M., Joseph-Bravo P., 2000. Effect of fasting on the content of thyrotropin-releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nutritional Neuroscience*. 3, 255-265.
25. Degroot A., Kashluba S y Treit D. 2001. Septal GABAergic and hippocampal cholinergic systems modulate anxiety in the plus-maze and shock-probe tests. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 69, 391-399.
26. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edn. 1994. American Psychiatric Association, Washington DC.
27. Drago F., Pulvirenti L., Spadara F. Y Pennisi G. 1990. Effects of TRH and prolactin in the behavioral dispair (swim) model of depression in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 15: 349-356.
28. Elkabir D.R. Wyatt M.E., Vellucci S.V. y Herbert J. 1990. The effects of separate or combined infusions of corticotropin-releasing factor and vasopressin either intraventricularly or into the amygdale on aggressive and investigative behavior in the rat. *Regulatory Peptides*. 28, 199-214.
29. Fleming A.A. y Todd A.J. 1994. Thyrotropin-releasing hormone- and GABA-like immunoreactivity coexist in neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research*. 638(1-2):347-351.
30. Fossey M.D., Lydiard R.B., Ballenger J.C., Laraia M.T. Bissette G. y Nemeroff C.B. 1993. Cerebrospinal fluid thyrotropin-releasing hormone concentrations in patients with anxiety disorders. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 5: 335-337.
31. French T.A., Masserano J.M., Weiner N., 1993. Influence of thyrotropin-releasing-hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 17:99-106.
32. Gary K.A., Sevarino K.A., Yarbrough G.G., Prange A. y Winokur A. The Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Hypothesis of Homeostatic Regulation: Implication for TRH-based Therapeutics. 2003. *perspectives in Pharmacology*. 305, 410-416.
33. Giovannini M.G., Casamenti F., Nistri A., Paoli F., Pepeu G. 1991. Effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis. *British Journal of Pharmacology*. 102: 363-368.
34. Glue P., Bailey J., Wilson S., Hudson A., y Nutt D.J. 1992. Thyrotropin-releasing hormone selectively reverses clorazepam-induced sedation but not flowing of saccadic eye movements. *Life Sciences*. 50: PL25-PL30.
35. Greenberg P.E. 1999. The economical burden of anxiety disorders in the 1990's. *Journal of Clinical Psychiatry*. 60: 427-435.

36. Gross C. y Hen R. 2004. The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*. 5: 545-552.
37. Gutiérrez-Mariscal M, De Gortari P., López-Rubalcava C. y Joseph-Bravo P. 2002. Participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina en la Ansiedad: Estudio preliminar a partir del modelo de Enterramiento Defensivo. Tesis de Licenciatura carrera de Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
38. Haisenleder D.J., Ortolano G.A., Dalkin A.C., Yasin M., Marshall J.C., 1992. Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology*. 130, 2917-23.
39. Hashimoto T., Wada T., Fukuda N., Nagaoka A. 1993. Effect of thyrotropin-releasing hormone on pentobarbitone-induced sleep in rats: continuous treatment with a sustained release injectable formulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 45: 94-97.
40. Heal D.J., Sabbagh A., Youdim M.B., Green A.R. 1981. Behavioural effects of central and peripheral injection of various analogues and metabolites of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Neuropharmacology* 20: 947-957.
41. Heinrichs S.C., Pich E.M., Miczeck K.A., Britton K.T. y Koob G.F. 1992. Corticotropin-releasing factor antagonist reduces emotionality in socially defeated rats via direct neurotropic action. *Brain Research*. 581, 190-197.
42. Herman J.P., Cullinan W.E., Ziegler D.R., Tasker J.G. 2002. Role of the paraventricular nucleus microenvironment in stress integration. *European Journal of Neuroscience*. 16: 381-385.
43. Heuer H., Martin K., Shaffer H., O'Donnell D., Walker P. y Bauer K., 2000. Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *The Journal of Comparative Neurology*. 428, 319-336.
44. Honkaniemi J.T. 1992. Colocalization of peptide and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivities with Fos-immunoreactive neurons in rat central amygdaloid nucleus after immobilization stress. *Brain Research*. 598, 107-113.
45. Honkaniemi J.T., Kainu T., Ceccatelli S., Rechardt L., Hokfelt T. y Pelto-Huikko M. 1992. Fos and jun in rat central amygdaloid nucleus and paraventricular nucleus after stress. *Brain Research*. 616, 114-125.
46. Hsieh KP & Martin TF 1992 Thyrotropin-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone receptors activate phospholipase C by coupling to the guanosine triphosphate-binding proteins Gq and G11. *Molecular Endocrinology* 6 1673-1681.
47. Imaki T., Shibasaki T., Hotta M. y Demura H. 1993. Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses: comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress. *Brain Research*. 616: 114-125.
48. Imamura M., Yamada M., Mori M., Prasad C. 1999 Thyrotropin releasing hormone stimulation of GABA-gated but not basal chloride ion influx in rat cerebellum. *Peptides*. 20(11), 1375-1379.
49. Itadani H, Nakamura T, Itoh J, Iwaasa H, Kanatani A, Borkowski J, Ihara M, Ohta M 1998 Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin releasing hormone receptors. *Biochem Biochemical and Biophysical Research Communications* 250: 68-71.
50. Itoh Y., Ogasawara T., Mushiroy T., Yamazaki A., Ukai Y., Kimura K. 1994. Effect of NS-3, a thyrotropin-releasing hormone analog, on *in vivo* acetylcholine released in rat brain: regional differences and its sites of action. *J Pharmacol Exp Ther* 271: 884-890.
51. Itoh Y., Ogasawara T., Yamazaki A., Ukai Y., Miura A. y Kimura K. 1994. Enhancement of noradrenaline release from rat frontal cortex by thyrotropin releasing hormone and its analog, (3R,6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinylcarbonyl-L-histidyl-L-prolinamide, as studied by intracerebral microdialysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 268 (1): 255-61.
52. Jaworska-Feil L., Budziszewska B. y Lason W. 1995. The effects of single and repeated morphine administration on the level of thyrotropin-releasing hormone and its receptors in the rat brain. *Neuropeptides*. 6, 343-349.

53. Kakucska I., Qi Y., Lechan R.M., 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 136, 2795-2802.
54. Kalivas P, Stanley D., y Prange A. 1987. Interaction between thyrotropin-releasing hormone and the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology*. 26, 33-38.
55. Kanda Y, Koike K, Ohmichi M, Sawada T, Hirota K y Miyake A 1994 A possible involvement of tyrosine kinase in TRH-induced prolactin secretion in GH3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 199 1447–1452.
56. Kavoussi R.J., Coccaro E.F., Klar H., Lesser J. y Siever L.J. 1993. The TRH-stimulation test in DSM-III personality disorder. *Biological Psychiatry*. 34 (4), 234-239.
57. Kiley SC, Parker PJ, Fabbro D y Jaken S 1991 Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *Journal of Biological Chemistry* 266 23761–23768.
58. Kluver, H. & Bucy, P. C. 'Psychic blindness' and other symptoms following bilateral temporal lobectomy. *American Journal of Physiology*. 119, 254–284 (1937).
59. König F., Hauger B., Barg T. y Wolfersdorf M. 1998. Thyroid parameters during therapy with zotepine in delusional depression. Preliminary results. *Neuropsychobiology*. 37(2), 88-90.
60. Koob G.F., Korte S.M., Korte-Bouws G.A. y Bohus B. 1994. Effect of corticotropin-releasing factor antagonist on behavioral and neuroendocrine responses during exposure to defensive burying paradigm in rats. *Physiology and Behavior*. 56 (1): 115-120.
61. Koob G.F., Heinrichs S.C., 1999. A role for corticotropin releasing factor and urocortin in behavioral rponses to stressors. *Brain Research Interactive*. 848, 141-152.
62. Korte S.M., 2001. Corticosteroids in relation to fear, anxiety and psychopathology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 25, 117-142.
63. Lechan R.M., Toni R., 1992 Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. In: Nemeroff CB (ed) *Neuroendocrinology*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 279-329
64. Lechan R.M., Wu P., Jackson I.M., 1986. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology*. 119, 1210-1216.
65. Lee E.H. y Tsai M.J. 1989. The hippocampus and amygdala mediate the locomotor stimulating effects of corticotropin-releasing factor in mice. *Behav Neural Biol*. 52, 412-423.
66. Lee S.L. Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing-hormone. 1988. *Journal of Biological Chemistry*. 263; 16604-16609.
67. Liang K.C. y Lee E.H. 1988. Intra-amygdala injections of corticotropin-releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. *Psychopharmacology*. 96, 232-236.
68. Loosen P.T. y Prange A.J. 1982. Serum thyrotropin response to thyrotropin-releasing-hormone in psychiatric patients: a review. *American Journal of Psychiatry*. 139: 405-416.
69. López-Rubalcava C., 1996. Pre- or post activity of 5-HT1A Compounds in mice depends on the anxiety paradigm. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 54, 677-686.
70. López-Ruvalcaba C. y Lucki, I. 2000. Strain differences in the behavioral effects of antidepressant drugs in the rat torced swimming test. *Neuropsychopharmacology* 22, 191-199.
71. MacLean, P. D. Psychosomatic disease and the 'visceral brain': recent developments bearing on the Papez theory of emotion. *Psychosomatic Medicine*. 11, 338–353 (1949).
72. Makino S., Gold P.W., Schulkin J. 1944a. Corticosterone effects on corticotropin-releasing-hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*. 640, 105-112.
73. Makino S., Gold P.W., Schulkin J. 1944b. Effects of corticosterone on CRH mRNA and content in the bed nucleus of the stria terminalis: comparison with the effects in the central nucleus of the amygdala and the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Research*. 657, 141-149.

74. Makino S., Hashimoto K. y Gold P.W. 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 73(1):147-58.
75. Mamalaki E., Kvetnansky R., Brady L.S. y Gold P.W. 1992. Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid levels in rat brain. *Journal of Neuroendocrinology* . 4, 689-699.
76. Mason J.W. 1968. A review of psychoendocrine research on the pituitary-thyroid system. *Psychosomatic Medicine*. 5, Suppl:666-81.
77. Mason J., Southwick S., Yehuda R., Wang S., Riney S., Bremner D., Johnson D., Lubin H., Blake D. y Zhou G. 1994. Elevation of serum free triiodothyronine, total triiodothyronine, thyroxine-binding globulin, and total thyroxine levels in combat-related posttraumatic stress disorder. *Archives of General Psychiatry*. 51(8), 629-41.
78. McEwen B.S. y Stellar E. 1993. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Archives of Internal Medicine*. 153(18):2093-2101.
79. Medina-Mora M.E., Borges G., Lara Muñoz C., Benjet C., Blanco Jaimes J., Flleiz Bautista C., Villatoro Velázquez J., Rojas Guiot E., Zambrano Ruíz J., Casanova Rodas L. y Aguilar-Gaxiola S. 2003. Prevalencia de Trastornos Mentales y Uso de Servicios: Resultados de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica en México. *Salud Mental*, Vol. 26. No. 4.
80. Millan M.J. 2003. The neurobiological control of anxious states. *Progress in neurobiology*. 70: 83-244.
81. Miyamoto M., Nagawa Y. 1987. Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *European Journal of Pharmacology*. 44: 143-152.
82. Moreau X., Azorin J.M., Maurel M. y Jeanningros R. 1998. Increase in red blood cell triiodothyronine uptake in untreated unipolar major depressed patients compared to healthy volunteers. *Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2, 293-310.
83. Mori.M. y Yamada M. ,1987. Thyroid hormones regulate the amount of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. *Journal of Endocrinology*. 114: 443-448.
84. Munck A, Guyre P.M. y Holbrook N.J. 1984. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocrinology Reviews*. 5(1):25-44.
85. Nemeroff C.B. y Evans D.L. 1989. Thyrotropin releasing hormone (TRH), the thyroid axis and affective disorders: a review. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 553: 304-310.
86. Nillni E.A. y Sevarino K. A., 1999. The Biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone-Derived Peptides. *Endocrine Reviews*. 20, 599-648.
87. Nomura M., Saito J., Ueta Y., Muglia L.J., Pfaff D.W. y Ogawa S. 2003. Enhanced up-regulation of corticotropin-releasing hormone gene expression in response to restraint stress in the hypothalamic paraventricular nucleus of oxytocin gene-deficient male mice. *Journal of Neuroendocrinology*. 11, 1054-61.
88. O'Leary R y O'Connor B., 1995. Thyrotropin-Releasing Hormone. *Journal of Neurochemistry*. 65 953-963.
89. O'Dowd B.F., Lee D.K., Huang W., Nguyen T., Cheng R., Liu Y., Wang B., Gershengorn M.C. y George S.R. TRH-R2 Exhibits Similar Binding and Acute Signaling but Distinct Regulation and Anatomic Distribution Compared with TRH-R1. 2000. *Molecular Endocrinology* 14: 183-193.
90. Ogasawara T., Itoh Y., Ukai Y., Yoshikuni Y., Kimura K. 1996. NS-3, a TRH-analog, reverses memory disruption by stimulant cholinergic and noradrenergic systems. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 53: 391-399.
91. Ohmichi M, Sawada T, Kanda Y, Koike K, Hirota K, Miyake A y Saltiel AR 1994 Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 269 3783-3788.

92. Okamoto, K. y Aoki, K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap. Circ. J.* 27, 282-293.
93. Papez, J. W. A proposed mechanism of emotion. *Arch Neurol. Psychiatry* 38, 725-743 (1937).
94. Paré W.P. 1990. Technique and strain comparisons in stress ulcer. *Annals New York Academy of Sciences.* 597, 223-230.
95. Paré W.P. 1992. The performance of WKY Rats on three test of emocional behavior. *Physiology and behavior.* 51, 1051-1056.
96. Paré W.P. 1994. Open Field, Learned helplessness, conditioned defensive burying and forced-swim test in Wistar Kyoto rats. *Physiology and Behavior.* 55, 433-439.
97. Paré W.P. y Redei E. 1993 Depressive behavior and stress ulcer in Wistar Kyoto rats. *Journal of Physiology Paris.* 87(4):229-38.
98. Paxinos G. y Watson C. 1998. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4th Edition. Academic Press Inc. San Diego, California. pp. 4-5, 9-17, 23-47, 80-116.
99. Pekary AE, Sattin A, Lloyd RL. Electroconvulsive seizures increase levels of PS4, the TRH-enhancing peptide [Prepro-TRH(160 - 169)], in rat brain. *Neuroendocrinology* 1997;65:377- 84.
100. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N. y Jalfre M. 1978. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *European Journal of Pharmacology.* 47: 379-91.
101. Porsolt R.D., Le Pichon M. y Jalfre M. 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature.* 266:730.
102. Prange A.J.J., Wilson J.C., Lara D., Alltop L.B. y Breese G.R. 1972. Effects of thyrotropin-releasing-hormone in depression. *Lancet.* 2: 999-1002.
103. Ray A, Henke P.G. y Sullivan R.M. 1990. Effects of intra-amygdalar thyrotropin releasing hormone (TRH) and its antagonism by atropine and benzodiazepines during stress ulcer formation in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 3:597-601.
104. Redei E.E., Solberg L.C., Kluczynski J.M. y Paré WP. 2001. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology.* 24(6):632-9.
105. Rittenhouse P.A., López-Rubalcava C., Stanwood G.D. y Lucki I. 2002. Amplified behavioral and endocrine responses to forced-swim stress in the Wistar Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology.* 27, 303-318.
106. Rosen J.B., Cain C.J., Weiss S.R., Post R.M., 1992 Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin-releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Brain Research Molecular Brain Research* 15, 247-255.
107. Rosen J.B., Kim S.Y., Post R.M., 1994 Differential regional and time course increases in thyrotropin-releasing hormone, neuropeptide Y and enkephalin mRNAs following amygdala kindled seizure. *Brain Research Molecular Brain Research.* 27, 71- 80.
108. Russell V., Allie S. y Wiggins T. 2000. Increased noradrenergic activity in prefrontal cortex slices of an animal model for attention-deficit hyperactivity disorder--the spontaneously hypertensive rat. *Behavioural Brain Research.* 117(1-2):69-74.
109. Sajdyk T.J., Shober D.A., Gehlert D.R. y Shekhar A., 1999. Role of corticotropin-releasing factor and urocortin within the basolateral amygdala of rats in anxiety and panic responses. *Behavioural Brain Research.* 100, 207-215.
110. Sarkar, Sattin A, Pekary AE. 2002. Effects of electroconvulsive (ECS) and kindling (KIN) shock on TRH-Peptides and Forced-Swim Test (FST). *Society for Neuroscience, Abstracts* 1992;18:899.
111. Sattin A., 1987. A possible role for thyrotropin releasing hormone (TRH) in antidepressant treatment. *Advance in Experimental Medical Biology.* 221,549-55.
112. Segerson T.P., Kauer J., Wolfe H.C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I.M.D., Lechan R.M., 1987. Thyroid hormones regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 238; 78-80.

113. Sharp T., Tulloch I.F., Benet G.W., Marsden C.A., Metcalf G., Dettmar. 1984. Analeptic effects of centrally-injected TRH and analogues of TRH in the pentobarbitone-anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 23: 339-348.
114. Shekhar · U. D. McCann · M. J. Meaney D. C. Blanchard · M. Davis · K. A. Frey · I. Liberzon K. L. Overall · M. K. Shear · L. H. Tecott · L. Winsky., 2001. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. *Psychopharmacology* 157:327-339.
115. Shian L.R., Wu H.M., Lin M.T., Ho L.Y. 1985 Hypothalamic involvement in the locomotor stimulant or satiety action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and amphetamine. *Pharmacology* 30: 259-265.
116. Smagin G.N., Heinrichs S.C. y Dunn A.J. 2001. The role of CRH in behavioral responses to stress. *Peptides* 22: 713-724.
117. Solberg L.C., Olson S.L., Turek F.W. y Redei E. 2001. Altered hormone levels and circadian rhythm of activity in the WKY rat, a putative animal model of depression. *Am J Physiol Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 281(3):R786-94.
118. Stahl C.E., Redei E., Wang Y., Borlongan, C.V., 2002. Behavioral, hormonal and histological stress markers of anxiety-separation in postnatal rats are reduced by preprothyrotropin-releasing hormone 175-199. *Neuroscience Letters*. 321, 85-89.
119. Strand F.L., *Neuropeptides. Regulators of Physiological Processes*. 1999. MIT Press. Cambridge, Massachusetts. pp 179-185.
120. Straub R.E., Frech G.C., Joho R.H., y Gershengorn M.C. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 87, 9514-9518.
121. Swiergiel L.W., Takahashi L.K. y Kalin N.H. 1993. Attenuation of stress-induced behavior by antagonism of corticotropin-releasing factor receptors in the central amygdala in the rat. *Brain Research*. 623, 229-234.
122. Tache Y., Lis M., Collu R., 1977. Effects of thyrotropin-releasing hormone on behavioral and hormonal changes induced by b-endorphin. *Life Sciences*. 21: 841-846.
123. Takeuchi Y., Tominaga M., Mitsufuji N., Yamazoe I., Kawase S., Nishimura A., Matsuo S., Sawada T., 1995 Thyrotropin-releasing hormone in treatment of intractable epilepsy: neurochemical analysis of CSF monoamine metabolites. *Pediatric Neurology*. 12,139 -145.
124. Tanaka M., Yoshida M., Emoto H. y Ishii H., 2000. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European Journal of Pharmacology*. 405, 397-406.
125. Thomson B.L. y Rosen J.B. 2000. Effect of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides* 34: 38-44.
126. Treit, D. 1989. A comparison of anxiolytic and nonanxiolytic agents in the shock-probe/burying test for anxiolytics. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 36, 203-205.
127. Treit, D., Pinel, J.P.J. y Fibiger, H.C. 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 15, 619-626.
128. Tukul R., Kora K., Hekim N., Oguz H. y Alagol F. 1999. Thyrotropin stimulating hormone response to thyrotropin-releasing-hormone in patients with panic disorder. *Psychoneuroendocrinology*. 24: 155-160.
129. Uribe R.M., Joseph-Bravo P., Pasten J., Mendez M., Covarrubias L. y Charli J.L. 1991. Some event of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology*. 54, 493-498.
130. Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 58(1):140-145.
131. Vale W.W., Spiess S., Rivier J. 1981. Characterization of e 41 residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*. 213, 1394-1397.

132. Van Cauter E. y Turek F.W. 2001. Roles of sleep-wake and dark-light cycles in the control of endocrine, metabolic, cardiovascular and cognitive function. En: Handbook of Physiology: A critical comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts. Vol. IV: Coping with the Environment, Neural and Endocrine Mechanisms, Section 7: The endocrine system. P.313-349. Editores: McEwen B.S. y Goodman H.M. Oxford University Press.
133. Vargas M.A., Bourdais J., Sanchez S., Uriostegui B., Moreno E., Joseph-Bravo P. y Charli J.L. 1998. Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *Journal of Neuroendocrinology*.3, 199-206.
134. Walker C.D., Anand K.J.S. y Plotsky P.M. 2001. Development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the stress response. En: Handbook of Physiology: A critical comprehensive presentation of physiological knowledge and concepts. Vol. IV: Coping with the Environment, Neural and Endocrine Mechanisms, Section 7: The endocrine system. P.237-270. Editores: McEwen B.S. y Goodman H.M. Oxford University Press.
135. Weiss S. y Uhde T., 1990. Chapter 1. Animal Models of Anxiety. *Neurobiology of Panic Disorder*. 3, 27-33.
136. Winokur A. y Utiger R. 1974. Thyrotropin-Releasing-Hormone: regional distribution in rat brain. *Science*. 185, 265-267.
137. Yamada M., Radovick S., Wondisford F.E., Nakayama Y., Weintraub B.D. y Wilber J.F. 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human preprothyrotropin-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. 4, 551-556.
138. Zabavnik J, Arbuthnott G y Eidne KA 1993 Distribution of thyrotrophin-releasing hormone receptor messenger RNA in rat pituitary and brain. *Neuroscience* 53 877-887.
139. Zigmond M.J., Bloom F.E., Landis S.C., Roberts J.L., Squire L.R., 1999. *Fundamental Neuroscience*. Academic Press. San Diego, California. pp 193-265, 1127-1137, 1434-1438.