

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**“Estudio del efecto del estrés agudo en el metabolismo del neuropéptido TRH
(Hormona Liberadora de Tirotropina) en el sistema límbico”**

Tesis que para obtener el título de:

BIOLOGA

P R E S E N T A :

DANIELA REBOLLEDO SOLLEIRO

Directora de Tesis:

Dra. Patricia I. Joseph-Bravo



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

2006

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Apellido paterno: Rebolledo

Apellido materno: Solleiro

Nombre (s): Daniela

Teléfono: 5594-1397

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera: Biología

2. Datos del tutor

Grado: Doctora

Nombre (s): Patricia Ileana

Apellido paterno: Joseph

Apellido materno: Bravo

3. Datos del sinodal 1

Grado: Doctora

Nombre (s): Patricia Bertha Judith

Apellido paterno: de Gortari

Apellido materno: Gallardo

4. Datos del sinodal 2

Grado: Doctora

Nombre (s): Milagros

Apellido paterno: Méndez

Apellido materno: Ubach

5. Datos del sinodal 3

Grado: Doctora

Nombre (s): Rosa María

Apellido paterno: Uribe

Apellido materno: Villegas

6. Datos del sinodal 4

Grado: Doctor

Nombre (s): Carlos

Apellido paterno: Sabas Cruz

Apellido materno: Fuentes

7. Datos del trabajo escrito

Título: "Estudio del efecto del estrés agudo sobre el metabolismo del neuropéptido TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina) en el sistema límbico"

Número de páginas: 78

Año: 2006

Agradecimientos

"A Dios, por quien existo y para quien existo"

Quiero agradecer primeramente a la UNAM por todo lo que me ha dado para mi formación profesional al mostrarme un panorama tan amplio y diverso en la esfera intelectual y social. Ser egresada de la Máxima Casa de Estudios de nuestro país es para mí motivo de profundo orgullo y satisfacción.

A mi familia. A mi Papá, Mamá, Merce y Luis, por estar de manera tan amorosa e incondicional apoyándome en cada etapa de mi vida. A mis hermanos: Omar, Meli, Beto, Gonzo y Javi, por estar a lado mío en las buenas y en las malas. A mis sobrinos: Diego, Julia, André y Emiliano, por llenarme de alegría con su ternura y sus ocurrencias. Con el amor de todos ustedes tengo una motivación continua para seguir adelante. ¡Los amo con todo mi corazón!

A Patricia Joseph, mi tutora de tesis, no sólo por el apoyo académico y económico, sino por toda la paciencia y la comprensión que mostró para conmigo durante todo este tiempo. Agradezco de igual manera al Dr. Jean-Louis Charli por sus atenciones y críticas para mejorar mi proyecto, así como a los Dres. Rosa María Uribe, Patricia de Gortari, Milagros Méndez y Carlos Sabas Cruz por su tiempo, comentarios y valiosas aportaciones para completar este trabajo.

A mis amigas inseparables de la Facultad, Iris y Minerva, por mostrarme una amistad sincera y por todas las buenas experiencias que tuvimos en las clases, las prácticas de campo, los laboratorios, etc. ¡La Facultad no hubiera sido lo mismo sin ustedes!

A mis compañeros del Taller, especialmente a Rodrigo por los buenos ratos compartidos; a Andrea y Mariana por las risas y las idas al cine. Su amistad durante el tiempo en la Facultad de Ciencias y en el IBT dejaron un buen sazón de boca en esta etapa de mi vida.

Al QFB. Miguel Císneros, Dra. Antonieta Cote Vélez y Fidelia Romero por el soporte técnico, la paciencia y todo el apoyo, ya que sin cuya ayuda no hubiera podido realizar este proyecto.

A mis compañeros del Laboratorio de Neurobiología del IBT, por compartir conmigo de su experiencia y conocimiento, además de mostrar siempre disposición para ayudarme a resolver mis dudas acerca del "enigmático" mundo de la ciencia. Muchas gracias por todo a Mariana, Arlen, Carlos, Vicente y Miriam. A la Dra. Martha Díaz y a Ana, por su agradable compañía durante las horas de comida y por la amistad que me brindaron durante mi estancia en el instituto. Muy especialmente a Alfonso por las risas, las reflexiones y las buenas charlas dentro del laboratorio.

A Manuel Villa, Miguel Olvera y Doña Elena Martel por todo el esfuerzo que realizan para que el laboratorio se mantenga funcionando todos los días y por mostrarme un trato siempre amable en lo que necesitaba.

A la Familia Flores que mostró su cariño, apoyo y generosa hospitalidad para conmigo durante todo el tiempo de la realización de mi trabajo de tesis en Cuernavaca. Me voy con ustedes clavados en los recuerdos y en mi corazón.
¡GRACIAS!

A mi segunda familia de Casa Sobre la Roca, especialmente a Víctor y Ari Valenzuela y todo mi equipo por el amor y la confianza depositada sobre mí. Gracias por siempre estar ahí, de veras que mucho de lo que hoy soy es por lo que ustedes han invertido en mi vida ¡Me tienen y yo a ustedes!

Indice

Capítulo		Página
	Resumen	
1.	Introducción	8
1.1	El estrés: una condición de alerta	8
	El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)	9
	Mecanismos moleculares del organismo en respuesta al estrés	11
1.2	El sistema límbico	14
	Vías reactivas al estrés en el sistema límbico	17
1.3	El estrés, las patologías humanas y los modelos animales	20
1.4	El modelo de Inmovilización	20
	Marcadores de estrés en el Modelo de inmovilización	22
1.5	Las neuronas peptidérgicas	23
1.6	Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) y el eje Tiroideo (HHT)	24
	El gen del TRH	26
	Biosíntesis del gen de TRH	27
	Receptores específicos para el TRH: TRH-R1 y TRH-R2	27
	Piroglutamil amino peptidasa (PPII)	29
	Regulación de las vías TRHérgicas	30
2.	Justificación	31
3.	Hipótesis	32
4	Objetivos	32

5.	Materiales y Métodos	33
6.	Resultados	44
7.	Discusión	59
7.1	La respuesta neuroendócrina del estrés psicológico agudo:	
	Eje HHA	59
	Eje HHT	60
7.2	Respuesta del sistema límbico por el estrés psicológico agudo	
	Amígdala	62
	Corteza frontal	63
	Hipocampo	63
	Septum	64
	Núcleo Accumbens	64
8.	Conclusiones	66
9.	Perspectivas	67
10.	Anexo	68
11.	Glosario	70
12.	Referencias	71

Resumen

El TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina), es un neuropéptido sintetizado a partir de un precursor de alto peso molecular que es procesado por actividad enzimática para poder ser liberado al sistema vascular hipofisiario y así activar la liberación de Tirotropina (TSH) (entre otras hormonas). La TSH estimula a la glándula tiroidea para secretar hormonas tiroideas, las cuales constituyen el producto final del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides y son importantes en el control homeostático de la energía y el metabolismo; además, tienen la capacidad de retroalimentar negativamente al TRH. A pesar de que este neuropéptido fue aislado originalmente del hipotálamo de mamíferos, hoy se sabe que se encuentra en zonas extra-hipotalámicas, como las estructuras límbicas. La concentración del péptido puede cambiar en respuesta a varios tratamientos experimentales agudos ó crónicos entre los que se encuentra el estrés, el cual se ha definido como un estado donde la homeostasis de los organismos es amenazado por cualquier estímulo adverso. El estrés de tipo psicológico es aquél que se presenta como consecuencia de estímulos estresantes "predecibles", que son los que ocurren en ausencia de retos fisiológicos, pero que conducen a una alteración homeostática en el organismo. Este trabajo tuvo como fin estudiar el efecto del estrés agudo sobre el metabolismo del TRH. Se escogió el paradigma de inmovilización (IMO) por ser el mejor caracterizado para el estudio del estrés psicológico. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar si las vías TRHérgicas del sistema límbico son moduladas por efecto del estrés psicológico agudo. Ratas Wistar fueron sometidas a una sola prueba de estrés por IMO en contenedores de acrílico, durante 30 minutos y sacrificadas por decapitación 15 (grupo G15) y 45 (grupo G45) minutos post-IMO. Los cerebros fueron extraídos y disecados, para obtenerse distintas regiones límbicas: amígdala, corteza frontal, hipocampo, hipotálamo (superior y medio-basal), núcleo accumbens y septum. El lado izquierdo se utilizó para realizar RIA de TRH y el derecho para RT-PCR de RNAm de pro-TRH, CRH y TRH-R. Además, se cuantificó la concentración de Corticosterona (CORT) y TSH sérica por RIA, como marcadores de la actividad del eje HHA (Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal) y HHT (Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides), respectivamente. Se encontraron cambios en el contenido de TRH y/o RNAm de pro-TRH en todas las regiones estudiadas, excepto el septum. Los cambios en los niveles del RNAm de TRH-R1 se encontraron solamente en el hipotálamo, corteza frontal, núcleo accumbens y de TRH-R2 en la amígdala. A nivel del mensajero de pro-CRH se encontraron cambios únicamente en hipotálamo y amígdala. En el hipotálamo se registró un aumento también del RNAm del receptor CRH-R1. Además, se encontró una importante liberación de CORT y una inhibición transitoria del eje tiroideo en el grupo G15. Estos resultados permiten sugerir que las neuronas TRHérgicas de la amígdala y el hipotálamo son afectadas por situaciones de estrés psicológico agudo y apoyan el papel del TRH como molécula neuromoduladora en el sistema límbico.

1. Introducción

1.1 El estrés: una condición de alerta

Se ha definido al estrés como un estado donde la homeostasis (el estado basal del organismo) es amenazado por cualquier estímulo adverso, físico ó emocional, interno ó externo [Páka K et al., 2001]; cuando el estrés se transforma en una reacción prolongada e intensa, es muy posible que desencadene serios problemas físicos y/ ó psicológicos.

De manera general, los estímulos estresantes pueden definirse como cualquier cambio en el ambiente potencialmente amenazante, que es censado por un organismo y que es capaz de disparar una respuesta crónica ó aguda [Steckler T et al., 2005]. Los estímulos estresantes pueden ser clasificados en dos grandes grupos [Herman JP et al., 2003]:

- a) los “reales” son aquellos que representan un reto metabólico que es detectado por los sistemas viscerales, somáticos y sensoriales del organismo, por ejemplo el frío, el dolor causado por una quemadura, una infección ó periodos largos de inanición.
- b) los “predecibles” son aquellos que ocurren en ausencia de estímulos sensoriales ó retos fisiológicos, pero que conducen a un desequilibrio homeostático en el organismo, ya que éste realiza un esfuerzo por desencadenar una respuesta hormonal para contrarrestar el desequilibrio que fue producido por el estímulo estresor. Un ejemplo sería el reconocimiento de alguna situación de peligro, como los ambientes novedosos ó la aparición de un depredador, en el caso de los animales. La gran gama de respuestas que se pueden producir por este tipo de estresores está finamente controlada por algunas regiones cerebrales que componen el sistema límbico (ver más adelante) y se generan por condicionamiento ó por predisposición especie-específica.

De acuerdo a esta clasificación, se pueden definir, entonces, dos tipos de estrés: el fisiológico, cuando el organismo responde a estresores “reales” ó el psicológico, cuando responde a estresores “predecibles”.

También es posible clasificar los tipos de estrés dependiendo de las estructuras cerebrales que los estímulos estresantes son capaces de activar. Así, se reconoce como estrés procesado a aquel que es capaz de activar al sistema límbico para desencadenar una cascada de señales que permitan darle un significado psicológico al estímulo estresante, mientras que se denomina estrés sistémico a aquel en donde no se activan las regiones extrahipotalámicas del sistema límbico [Herman JP et al., 1997].

El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA)

En respuesta al estrés se disparan un conjunto de procesos en el organismo [de Kloet ER, et al., 2005], que se activan de manera inmediata y pueden ser de dos tipos: el sistema adrenérgico y el neuroendocrino (eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, HHA). El sistema adrenérgico, aunque es parte del eje adrenal, forma parte del Sistema Nervioso Simpático y responde mediante la liberación al torrente sanguíneo de una sustancia llamada adrenalina, que agudiza los sentidos permitiendo la recepción de mayor información del medio ambiente. Los efectos se ven de manera inmediata con una gran liberación de energía manifestada por taquicardia, taquipnea, aumento de flujo sanguíneo a los músculos para realizar acciones vigorosas; en conjunto, estas reacciones preparan al organismo para “pelear ó huir” en condiciones de alerta.

Por otra parte, el sistema neuroendocrino está formado por el hipotálamo que libera la Hormona Liberadora de Corticotropina (CRH, por su nombre en inglés, Corticotropin Releasing Hormone) al sistema porta que irriga la hipófisis anterior y controla así la síntesis y liberación de la ACTH (Hormona Adrenocorticotrópica); ésta es liberada al torrente sanguíneo, donde se transporta hasta la corteza de las glándulas adrenales, para promover la liberación de glucocorticoides (GC) (cortisol en humano y corticosterona en rata, ver figura 1). Un aumento en los niveles de GC tienen la capacidad de retroalimentar negativamente la síntesis de CRH en el hipotálamo y de ACTH en la hipófisis, disminuyendo su síntesis y liberación [Squire LR, et al., 2003] y de esa manera, restaurar el desequilibrio homeostático que se generó por la condición de alerta (Figura 2). La concentración de los glucocorticoides en el torrente sanguíneo aumenta drásticamente entre los 15 y 30 minutos después del estímulo estresante y estos niveles alcanzan nuevamente los basales entre 60 y 90 minutos posteriores a éste [de Kloet ER, et al., 2005].

Los glucocorticoides intervienen en múltiples procesos metabólicos tendientes a proveer de energía al organismo (degradación y utilización de glucógeno). Afectan también el sistema cardiovascular y modulan respuestas inmunes [Bear MF, et al., 2001]; coordinan adaptaciones del comportamiento a condiciones internas y externas, regulando circuitos neurales al actuar sobre mecanismos de expresión de genes clave para la expresión de proteínas reguladoras [Mc Ewen BS, et al. 1993]. Por lo anterior, influyen en procesos como la atención, la percepción, la memoria y las emociones; afectan de manera diferencial al Sistema Nervioso Central inhibiendo, por ejemplo, la actividad neuronal en hipocampo y estimulando la de amígdala, lo cual repercute en funciones cognitivas y del comportamiento [Ericsson K, et al. 2003].

Así, el eje HHA juega un papel vital en la adaptación del organismo ante los retos homeostáticos que se enfrentan en las situaciones de estrés.

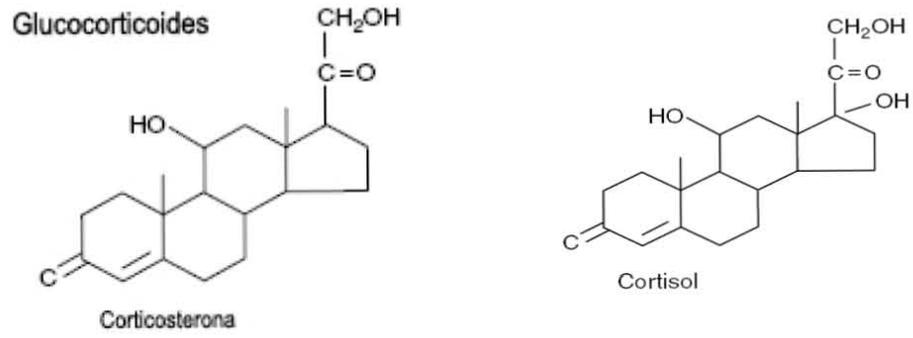


Figura 1. Estructura química de los Glucocorticoides, Corticosterona en ratas, Cortisol en humanos.

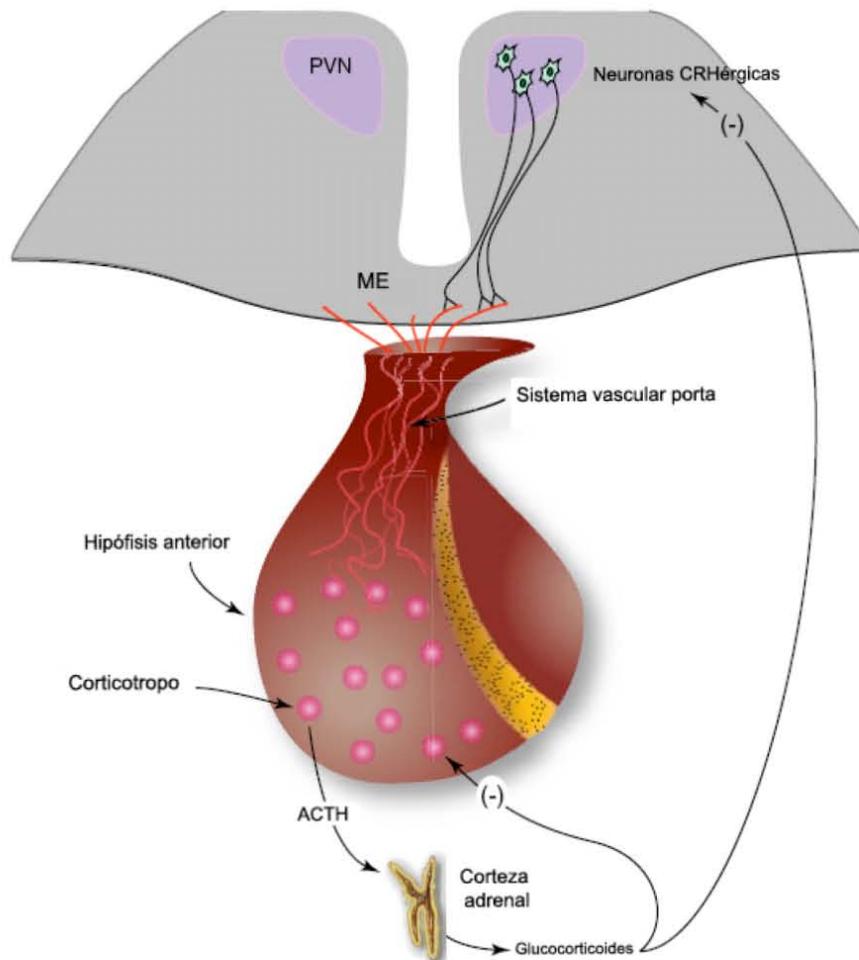


Figura 2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.
(Tomado de Squire, et al., 2003)

Mecanismos moleculares del organismo en respuesta al estrés

a. Mecanismos inducidos por los receptores de Glucocorticoides (GR)

Además de las respuestas inmediatas al estrés, existen mecanismos lentos de adaptación que tienen la capacidad de alterar la expresión de algunos genes, procesos que son mediados principalmente por los receptores de glucocorticoides (GC) (receptores a glucocorticoides ó GR y receptores a mineralocorticoides ó MR). Estos pueden responder a retos metabólicos agudos en los organismos, pero pueden adaptarse a tratamientos crónicos. Los GR y MR son el blanco de la misma hormona (Cortisol en humanos, corticosterona en ratas), pero la afinidad de estos por los MR es diez veces mayor por los GC; así, los MR se mantienen activos con las concentraciones basales de GC. En contraparte, los GR solamente son activados cuando existen grandes cantidades de GC (durante los picos circadianos y el aumento producido durante la respuesta al estrés) y son los responsables de restablecer el estado homeostático del organismo en situaciones de estrés (durante la fase de recuperación) [de Kloet RE, et al., 2005].

Los GC pueden regular la expresión de genes blanco de dos maneras distintas: 1) transcripcionalmente, a través de la interacción directa del GR en forma homo ó heterodimérica y el elemento de respuesta a GC (GRE) ó en su forma monomérica para interactuar con factores de transcripción y regular su actividad transcripcional y también son capaces de inducir la síntesis de algunos neuropéptidos, como el CRH y TRH [de Kloet RE, et al., 2005; Cote Vélez, et al. 2005] y 2) post-transcripcionalmente, a través de la alteración de la estabilidad del RNAm [Ver en de Kloet RE et. al, 2005].

Finalmente, se sabe que existen cambios celulares rápidos que pueden ser mediados por los receptores a GC, que son no-transcripcionales y que repercuten en muchas respuestas fisiológicas (como la inhibición de la función del eje HHA) y conductuales (como la agresión) de los organismos. Estos efectos rápidos se piensa que son, filogenéticamente hablando, un tipo de función ancestral de las hormonas esteroideas, que permiten acentuar las conductas que son evolutivamente importantes para la adecuación de los individuos en situaciones de estrés y funcionan a través de la activación de las neuronas motoras del cerebro primitivo que están conectadas al tallo cerebral. Entre las regiones activadas se encuentran algunas estructuras límbicas, como la amígdala y el hipocampo [Dallman MF, 2005].

b. Señalización llevada a cabo por los receptores de CRH (CRH-R1 y CRH-R2)

Los receptores de CRH-R1 y CRH-R2, forman parte de una superfamilia de proteínas membranales del tipo de receptores acoplados a proteínas G, que está caracterizada por la presencia de 7 dominios transmembranales y un sitio de unión a proteínas G que se localiza intracelularmente y el sitio de reconocimiento a la hormona (Ver figura 3).

CRH-R1 y CRH-R2 comparten un 70% de homología en su secuencia de aminoácidos y pertenecen a la subfamilia clase B, que incluye a los receptores que tienen por ligando a péptidos pequeños [Dautzenberg, et al., 2001]. El CRH-R1 es el receptor cuya distribución está más extendida en el cerebro y en la adenohipófisis, mientras que el CRH-R2 está expresado principalmente en los vasos periféricos, el corazón y en estructuras subcorticales del cerebro [Tisgo C, et al., 2002].

Una vez que el ligando, en este caso CRH, se une a los receptores, se produce la activación de la adenilato ciclasa (AC) mediada por proteínas G lo cual hace que se incrementen los niveles de AMPc. Este segundo mensajero es capaz de unirse a la subunidad reguladora de la PKA para translocarse al núcleo y así producir la fosforilación de una gran variedad de proteínas, entre las que se encuentra el factor de transcripción CREB. Éste, al ser fosforilado por la PKA, es capaz de modular la transcripción genética, pues tiene la capacidad de interactuar con la proteína CBP (CREB binding-protein), que hace contacto con el aparato basal de transcripción [de Kloet et al., 2005; Squire LR, et al., 2003]. Además de la vía de la adenilato ciclasa, se ha demostrado que la activación de los receptores de CRH produce un incremento en la actividad de otras vías de señalización, como la MAP cinasa, el incremento de calcio y la fosfolipasa C [de Kloet, et al., 2005].

Estudios *in vitro* han demostrado que la administración de CRH a células hipofisarias produce una disminución sostenida de los niveles de RNAm del receptor CRH-R1, pero de manera transitoria en condiciones *in vivo*, donde se ha observado que las inyecciones de CRH ó el estrés agudo disminuyen los niveles del mensajero de CRH-R1 después de 2 h y recuperando sus niveles normales ó incluso aumentando, 4 h posteriores a la condición experimental [Ver en Joseph-Bravo et al., 2006]. Condiciones de estrés prolongado (2 h) por inmovilización (IMO) incrementa los niveles del mensajero de CRH-R1 en el PVN, pero no en la amígdala [Makino S, et al., 1995]; se postula que este incremento está regulado por el mismo CRH proveniente de núcleos hipotalámicos o amigdalinos. Estos datos, permiten postular la participación del sistema CRHérgico y de sus receptores en los eventos de estrés psicológico en los organismos.

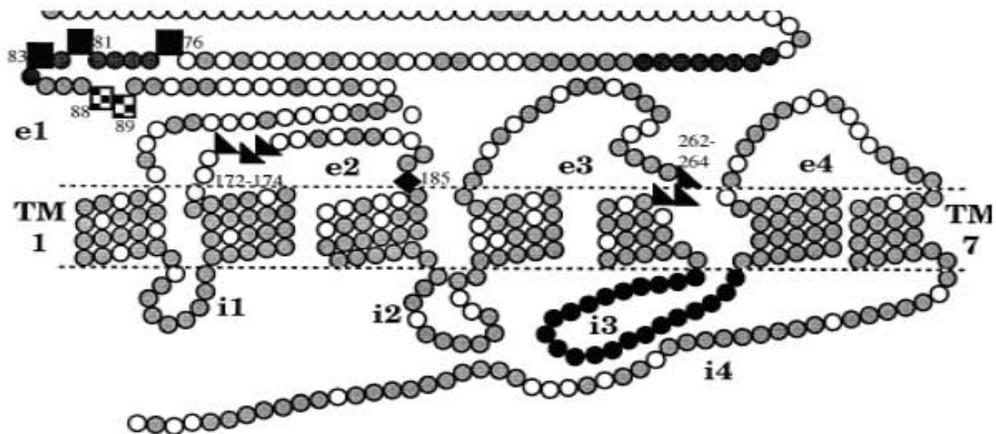


Figura 3. Representación esquemática del receptor de CRH.
(Tomado de Dautzenberg FM, et al. 2001)

c. Genes de expresión inmediata (Immediate-early genes).

Se les denomina así a los genes que se activan rápidamente (en cuestión de minutos) de manera transitoria y sin requerir la síntesis de nuevas proteínas. Estos genes son utilizados como marcadores de activación neuronal, como es el caso del gen *c-fos*, el cual se expresa en varias regiones cerebrales en respuesta a varios estímulos psicológicos y fisiológicos, entre los que se encuentran los choques electroconvulsivos, los retos osmóticos y el estrés.

Estudios previos han demostrado que en animales estresados psicológicamente (por inmovilización), existe un incremento en la expresión del RNAm de *c-fos* y su proteína en distintas regiones del sistema límbico como el hipotálamo, la amígdala, la corteza frontal y el hipocampo y que este incremento depende de la duración y el tipo de estresor que se aplica al animal [Mohammad G, et al., 1999; Briski K et al., 2001].

Otros factores de transcripción como el BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), el NGF (Nerve Grow Factor) y otras neurotrofinas (como NT-3) y sus receptores, que corresponden a la familia *trk*, aumentan la expresión de su RNAm durante tiempos cortos de IMO, mientras que ésta disminuye cuando los animales son sometidos a tiempos prolongados de IMO (8 h) ó a paradigmas de estrés repetido [Smith MA et al., 1995 y Ueyama T, et al. 1997 y Marmingère F et al., 2003].

Algunos de estos genes son regulados por el factor de transcripción que responde a AMPc (CREB) en su estado fosforilado; esta fosforilación ocurre a través de la cinasa-A en respuesta a activación neuronal.

Los cambios en la expresión de estos genes pueden representar señales moleculares que repercutan en cambios estructurales y funcionales en el cerebro, como la plasticidad neuronal, la LTP (long-term potentiation) y procesos de memoria que comparte algunos circuitos neurales con el estrés [Marmingère F et al., 2003].

1. 2 El sistema límbico

El término "sistema límbico" se remonta a los estudios realizados por Paul Broca (1824-1880), quien describió una estructura a manera de anillo en las zonas corticales, que rodeaba el tallo cerebral, a la que denominó "lóbulo límbico" (por la palabra latina limbus, que significa borde). Más tarde, Papez demostró que el lóbulo límbico descrito por Broca estaba involucrado en la generación de las emociones, y denominó "circuito de Papez" a las estructuras corticales que estaban conectadas con el hipocampo. Fue hasta que Kluver y Bucy demostraron la importancia del lóbulo temporal, que incluye a la amígdala, que se adjudicó un papel importante a esta estructura en la expresión de las emociones, especialmente en la ansiedad [Fuchs E, et al., 2003].

Hoy día se conoce como sistema límbico al conjunto de estructuras cerebrales multisinápticas, que hipotéticamente están involucradas en el procesamiento y expresión de las emociones [Bear MF, et al., 2001]; está compuesto por distintas regiones cerebrales, entre las que se encuentran:

Hipotálamo: formado por 40 núcleos neuronales distintos, actúa como un centro integrador de la información en el Sistema Nervioso ya que está estrechamente comunicado con el resto de las estructuras cerebrales, el sistema autónomo y el endocrino. Además de regular mecanismos como la homeostasis, la sed, el apetito, la función reproductora, las funciones autonómicas, la termorregulación, etc., juega un papel importante al ser un nodo regulador del control y expresión de la conducta de los organismos [Squire LR, et al., 2002]. Específicamente, el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo funge como el último punto del cerebro que recibe información de las áreas cerebrales superiores (las aferencias límbicas a las neuronas parvocelulares del PVN) [Seckler T, et al., 2005] y envía señales hormonales hacia la hipófisis para controlar la función endocrina o, enviando señales neurales hacia el sistema autónomo. La proximidad y la interconexión de las neuronas hipofisiotrópicas, hipofisiarias y preautonómicas de este núcleo indican que éste es capaz de funcionar como una unidad integrada, que trabaja a distintos niveles para producir adaptaciones en el organismo ante situaciones de estrés real ó

percibido [Herman JP, et al., 2002]. La convergencia de las entradas límbicas en la *estria terminalis* hipotalámica y las poblaciones celulares de la periferia del PVN indican que un filtro activo de información ocurre en estas regiones. Se propone que estas poblaciones celulares sopesan la información que proviene de los sitios límbicos antes de mandarlos de manera integrada al PVN [Herman JP, et al., 2005].

Corteza frontal: juega un papel central en el control cognitivo, pues parece ser un integrador de la información externa e interna, para producir una conducta con una meta específica [Squire LR, et al., 2002]. Está conectada con la amígdala, por lo que produce una autorregulación del afecto, además de llevar a cabo una modulación de las funciones neuroendócrinas y autonómicas. Esta región recibe proyecciones noradrenérgicas del locus coeruleus, las cuales son muy sensibles al estrés y son suficientes para regular el eje HHA [Hermann JP, et al., 2003]. La corteza frontal, específicamente en su porción medial, modula la activación del eje HHA, ya que manifiesta una intensa expresión de *c-fos* después de inducirse estrés agudo por inmovilización (IMO) en animales experimentales [Mohammad G, et al., 2000]. Además, se ha observado que las lesiones en esta región aumentan la secreción de ACTH, CORT y la inducción de *c-fos* en PVN después de periodos de IMO [Herman JP, et al., 2003]. Evidencias anatómicas muestran que la corteza cerebral no tiene conexión directa con el PVN; sin embargo ésta es capaz de ejercer su influencia a través de conexiones neurales con la corteza cingulada y con el núcleo talámico paraventricular, que es una estructura íntimamente involucrada con la actividad del eje HHA en situaciones de estrés crónico. Se sabe que la corteza frontal recibe innervaciones del hipocampo ventral, sugiriendo que estas regiones pueden actuar en concierto para modular varios circuitos reguladores del estrés [Herman JP, et al., 2003]. Además, participa como una estructura excitadora de la respuesta al estrés, pues está implicada en la regulación de la retroalimentación negativa del eje HHA [Herman JP, et al., 2003] y en la integración de la información de los factores estresantes [Herman JP, et al., 1997].

Hipocampo: está involucrado en el aprendizaje espacial y en otorgar un significado a los eventos en el tiempo y el espacio así como en las respuestas de miedo asociadas al contexto de situaciones estresantes [Herman JP, et al., 2003]. Esta estructura límbica juega un papel importante en el procesamiento de las emociones, especialmente en los aspectos de aprendizaje y memoria y está involucrada en el control de los circuitos autonómicos [Fuchs E, et al., 2003]. El hipocampo emite proyecciones indirectas al PVN que permiten la comunicación de la información aprendida, y, por consecuencia, al eje HHA. Se sabe también que existen interconexiones entre el hipocampo y la amígdala, que pueden estar involucradas en la evaluación del ambiente, información que puede ser después integrada de una manera apropiada para activar el eje HHA de manera específica al estresor [Seckler T, et al., 2005; Herman JP, et al., 2003]. Existen evidencias de que el estrés por IMO puede

aumentar la secreción de ACTH y CORT de manera prolongada después de una lesión hipocampal. Además, se ha visto que la pérdida de la función hipocampal resulta en una hipersecreción de ACTH y CORT en el eje HHA [Herman JP, et al., 2003]. Es una región particularmente susceptible al aumento de glucocorticoides (GC) que en situaciones de estrés prolongado producen atrofia neuronal [Mc Ewen BS, et al., 1997]; por ejemplo, el estrés por IMO ó el tratamiento con corticosterona induce una atrofia reversible en las dendritas de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo, indicando así, que los GC séricos secretados durante las situaciones de estrés pueden llegar a producir alteraciones morfológicas neuronales en esta región límbica [Fuchs, et al., 2003].

Amígdala: tiene un papel central en otorgar un valor emocional a las experiencias. Es una estructura límbica que está fuertemente involucrada en la respuesta al estrés. Los núcleos amigdalinos contribuyen a mediar la actividad del eje neuroendocrino y con ello, los estados de alerta emocionales y el estrés, actividad que influye directamente sobre los procesos de memoria y aprendizaje [Akirav I, et al., 2005]. En esta región se pueden distinguir tres núcleos distintos: la Amígdala Central (CeA), la Medial (MeA) y la Basolateral (BLA). La CeA está involucrada en la integración de respuestas conductuales al miedo y la ansiedad, además de modular la activación del eje HHA, y su estimulación promueve la biosíntesis y liberación de CORT en ratas y la secreción de ACTH en humanos; la MeA parece activarse al percibir estímulos predecibles, entre ellos IMO. Por otra parte BLA es una estructura reguladora del estrés ya que es dramáticamente activada por estresores predecibles, incluyendo IMO. Así, las porciones CeA y MeA-BLA permiten a los organismos distinguir entre el estrés fisiológico y el psicológico [Hermann JP, et al., 2003]. El núcleo basolateral de la amígdala recibe información sensorial que es procesada y transmitida al núcleo central, actividad que dispara la respuesta al estrés por la vía de la *estria terminalis* que activa el eje HHA por medio de neuronas CRHérgicas [Fuchs E, et al., 2003]. Además, se ha propuesto que BLA es importante en la re-evaluación del significado emocional de un estímulo [Seckler T, et al., 2005] y que está involucrada en modular la formación de memoria a largo plazo asociada con eventos de alerta emocionales en otras estructuras cerebrales, como el hipocampo [Akirav I, et al., 2005]. La información aprendida de la valoración afectiva del estímulo parece ser enviada al centro del núcleo accumbens a través del *striatum* donde los efectos del proceso de aprendizaje pueden ser potenciados por la acción dopaminérgica [Seckler T, et al., 2005].

Septum: es una estructura que presenta sensibilidad a las situaciones de estrés psicológico, prolongando las respuestas adrenales, además de participar en conjunto con el hipocampo como activador de procesos de ansiedad. Al inervar de forma indirecta al PVN con proyecciones GABA y glutamatérgicas, tiene la capacidad de excitar ó inhibir la actividad del PVN [Herman JP, et al., 2003]. Esta región límbica muestra una intensa inducción neural producida por distintos estresores

predicibles y las lesiones producidas en sus divisiones medial y lateral afectan la respuesta adrenal a la IMO [Herman JP, et al., 2003]. El sistema septo-hipocampal está conectado con la amígdala, que está estrechamente relacionada con el procesamiento de la información relativa al estrés. Esta conexión es crucial para la generación de la exploración y los componentes autonómicos de la ansiedad, que es parte de la respuesta al estrés [Seckler T, et al., 2005].

Núcleo Accumbens: Si bien no se considera como una parte del sistema límbico, el núcleo accumbens (NAcc) forma parte de la vía mesolímbica del cerebro anterior, que está involucrada con los mecanismos de recompensa y la neurobiología de las drogas de abuso. Es una estructura heterogénea, que presenta un núcleo ("core") y una capa externa ("shell"), y forma parte de "amígdala extendida" pues tiene una porción del núcleo central de la amígdala. En conjunto, la amígdala y el NAcc forman el circuito del hedonismo (ó del placer) [Squire LR, et al., 2003]. El sistema hedónico y el eje HHA parecen estar conectados. Existen evidencias que muestran que la estimulación del NAcc inhibe la secreción de CORT [Saphier D, et al., 1985]; también se ha observado que la microinyección de CRH en esta región produce la inducción de genes de expresión inmediata, como *c-fos* [Rybnicova EA, et al.2001] y que la inyección intracerebroventricular de CRH ovina tiene efectos estimulatorios en las neuronas dopaminérgicas del NAcc [Pan JT, et al., 1995]; ésta activación neural puede ser la responsable de algunos cambios conductuales que tienen que ver con la conducta de ansiedad en los roedores. Además, el NAcc como parte del *estriatum*, tiene un papel importante en la locomoción y procesos de aprendizaje motor [Del Bel et al., 2005].

Vías reactivas al estrés en el sistema límbico

El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) está innervado de manera directa e indirecta por distintas proyecciones neurales que provienen de regiones intra y extrahipotalámicas, que ayudan en conjunto a regular las funciones homeostáticas del organismo. Entre las proyecciones directas extra-hipotalámicas que recibe el PVN, se encuentran neuronas del órgano subfornical, que le permiten regular el balance electrolítico de los fluidos corporales, proyecciones del núcleo del tracto solitario y del núcleo parabraquial; entre las proyecciones intrahipotalámicas se encuentran las del hipotálamo lateral, del hipotálamo dorsomedial, de los núcleos arcuatos, entre otras regiones, que funcionan como aferencias de sistemas de señalización de los sistemas autónomo, metabólico e inmune. La mayoría de estas proyecciones son glutamatérgicas, aunque existen también proyecciones de la *estria terminalis* que son predominantemente GABAérgicas, sugiriendo así una influencia excitadora e inhibitoria sobre el PVN, de modo que éste pueda actuar de forma rápida para regular el funcionamiento del eje HHA [Ver en Herman JP, et al., 2003].

Dentro de las proyecciones indirectas que recibe el PVN se encuentran aquellas que pertenecen al sistema límbico (el núcleo medial de la amígdala, la corteza pre-frontal y el septum lateral), las cuales, como se mencionó, afectan la activación del eje HHA. Estas regiones emiten proyecciones neurales al tallo cerebral y a la *estría terminalis*, que inervan de forma directa al PVN y de esa forma son capaces de influir en la respuesta a estresores predecibles y, por lo tanto, a situaciones de estrés psicológico.

Las redes límbicas son alteradas de modo tal que las experiencias son recordadas y se mantiene la capacidad de respuesta al estrés para eventos futuros [de Kloet RE, et al., 2005]. Cabe mencionar que los circuitos límbicos reactivos al estrés actúan de manera específica al estímulo estresante [Palkovits M, et al., 2000], por ejemplo, el estrés por inmovilización puede producir un aumento en la síntesis y liberación de CRH en hipotálamo y en amígdala, así como una liberación de ACTH de la hipófisis y CORT, no así con estrés inducido por éter [Salposky, et al., 1984]. La modulación de la expresión de CRH en amígdala se ha reconocido como un marcador de el estrés psicológico; la administración central de este péptido reproduce muchos de los comportamientos de miedo y ansiedad que se observan al estimular la amígdala [Ver en Heinrichs SC, et al. 1995].

De esta manera, podemos darnos cuenta que la respuesta al estrés psicológico está compuesta por distintos sistemas: el simpático, a través de la vía noradrenérgica; el neuroendócrino, a través del eje HHA y el sistema límbico, a través del sistema CRHérgico extrahipotalámico, contenido en las estructuras que lo componen. Estos sistemas actúan en concierto para generar una conducta determinada ante el estímulo estresante, lo cual es posible observar en la Figura 4.

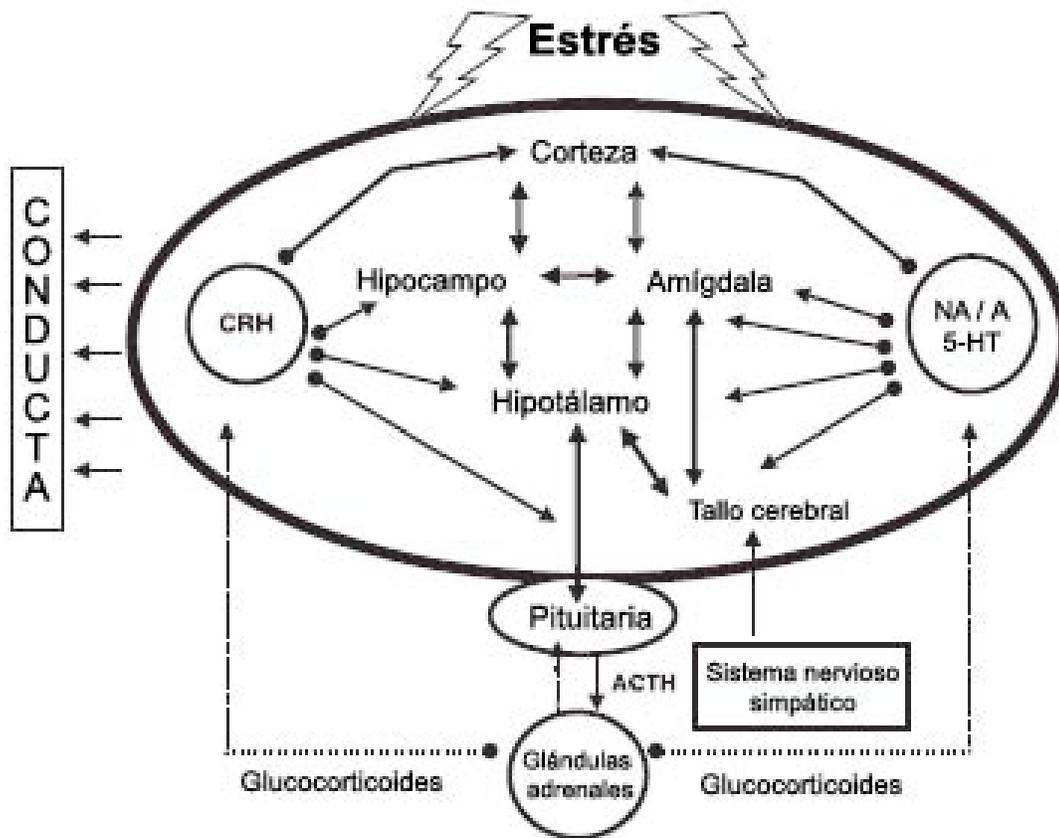


Figura 4. Representación esquemática de los principales componentes del sistema límbico, neurotransmisores moduladores y las conexiones que presentan con los sistemas que median la respuesta al estrés: el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal y el Sistema Nervioso Simpático. (Tomado de Fuchs E, et al., 2003).

1.3 El estrés, las patologías humanas y los modelos animales

El preponderante papel del sistema CRHérgico en la fisiología y el comportamiento de los organismos vivos en respuesta al estrés se ha asociado con psicopatologías humanas [de Kloet et al., 2005]. Lo anterior ocurre, principalmente, como consecuencia de: 1) el exceso de secreción de GC y 2) deficiencias en los procesos de señalización celular mediadas por los GC y sus receptores (de los cuales se habló en la sección 1.1) [Ver en Raison y Miller, 2003]. Estos eventos están relacionados con estados patológicos como pueden ser la depresión, la fibromialgia, el síndrome de fatiga crónica, el desorden de estrés post-traumático (PTSD, post-traumatic stress disorder) y la ansiedad. Los estados de estrés también se han relacionado con problemas cognitivos, alteraciones en el sueño, desórdenes alimenticios (como la anorexia nerviosa), cambios en el volumen de algunas estructuras cerebrales, (como el hipocampo), resistencia a la insulina y/o diabetes, osteoporosis, afecciones cardiovasculares, deficiencias en las respuestas inmunes, entre otros [Ver en Raison y Miller, 2003]. De aquí la importancia de profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados y las consecuencias que los eventos estresantes producen en los seres vivos.

Los modelos animales, como el presentado en este trabajo (ver más adelante), son diseñados con el fin de intentar reproducir respuestas fisiológicas similares a las patologías humanas. Constituyen así una herramienta sumamente útil para estudiar los trastornos del comportamiento, pues permiten determinar las anomalías bioquímicas y fisiológicas de los organismos y de esa manera, poder postular estrategias para su tratamiento.

1.4 El modelo de Inmovilización

El modelo de inmovilización (IMO) es un procedimiento experimental desarrollado para estudios biomédicos relacionados con el estrés psicológico ó psicosomático. El término hace referencia a que durante el procedimiento no se lleva a cabo ningún tipo de técnicas físicas ó traumas histológicos en el animal. Sin embargo, la respuesta al estrés es iniciada en el cerebro como producto de la angustia que el animal presenta al ser incapaz de moverse libremente, debido a que permanece en una superficie con espacio limitado, durante un tiempo definido (dependiendo de la estrategia experimental) [Golub MS, et al., 2004]. Este modelo ha sido reconocido en la literatura como un medio adecuado para estudiar eventos de estrés psicológico debido a que no se somete al animal a ninguna variación metabólica (por ejercicio ó ayuno, por ejemplo).

Los procedimientos de inmovilización fueron validados como agentes estresantes al observar la relación que éstos tenían con la formación psicogénica de úlceras en los animales estudiados [Ver en Pare WP et al. 1986 y Glavin GB et al., 1994], así como por la capacidad de producir una respuesta adrenal.

Algunos de los índices utilizados para determinar si se activan los mecanismos de estrés en los organismos al aplicar el estímulo estresante (en este caso, IMO) son los siguientes [Golub MS, et al., 2004]:

- 1) La disminución del peso del timo, debido a que los glucocorticoides inducen apoptosis en los timocitos.
- 2) La analgesia inducida por estrés, que se puede definir como una reducción de la respuesta al dolor, que es acompañada de la activación de los mecanismos de estrés. En roedores se evalúa colocando una lámpara de alta intensidad (que produce calor), directamente en la cola.
- 3) La concentración de corticosterona sérica, que determina claramente la activación del eje HHA como respuesta al estrés.

Se han desarrollado varios tipos de inmovilización en donde se pueden distinguir distintas modalidades (severas ó medianamente severas), dependiendo del procedimiento realizado. La modalidad más severa se lleva a cabo sujetando las extremidades de la rata a una tabla de madera ("immobilization stress"), mientras que algunas menos severas limitan el movimiento de los animales en contenedores de acrílico ("restraint stress") ó en plataformas elevadas con superficies limitadas [Ueyama T, et al., 1997; Kuroda Y, et al., 1998; Palkovits M, et al., 2000; Paskitti ME, et al., 2000; Lombardo KA, et al., 2001; Dal-Zotto S, et al., 2002; Ginsberg AB, et al., 2003; Maroun M, et al., 2003].

Para esta trabajo hemos elegido el método de Ginsberg y Lombardo (2003 y 2001, respectivamente) que es uno de los mejor caracterizados. Las ratas se colocan en tubos de acrílico transparentes, (de 23.5 cm de largo y 7 cm de diámetro), quedando completamente restringidas en su movimiento [Ginsberg AB, et al., 2003 y Lombardo KA, et al., 2001]; los animales pueden mover sus extremidades y la cabeza libremente, pero no pueden caminar ni para adelante, ni para atrás [Golub MS, et al., 2004].

La imagen siguiente presenta uno de los inmovilizadores construido en nuestro laboratorio para la realización del presente proyecto.



Figura 5. Inmovilizador de acrílico construido en el Laboratorio de Neurobiología Molecular del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Marcadores de estrés en el modelo de inmovilización.

Existe una gran cantidad de estudios que han determinado el comportamiento de los marcadores de estrés en roedores, donde se ha observado que existe un pico máximo en los niveles de corticosterona [Mc Ewen BS, et al., 1997], de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) [Mc Ewen BS, et al., 1997] y los receptores a glucocorticoides (GR) (en hipotálamo e hipocampo) [Paskitti ME, et al., 2000] a los 30 minutos de haber aplicado el estímulo estresante y regresando a sus niveles basales aproximadamente 2 horas posteriores a la prueba. Imaki, y colaboradores describieron este mismo comportamiento para el RNAm de CRH y de su receptor CRH-R1 (2h post-IMO) en el PVN [Imaki T, et al., 2001]; en la amígdala también se incrementa la liberación de CRH y la expresión de RNAm de CRH después de 1 hora de IMO [Kalin NH, et al., 1994].

En las neuronas parvocelulares del PVN la expresión del mensajero *de fos* se ve incrementada después de 30 minutos de estrés por IMO [Imaki T, et al., 2001] y la expresión de su proteína Fos se incrementa después de 2 horas en distintos núcleos del hipotálamo, incluyendo al PVN. En las regiones límbicas (amígdala, corteza frontal e hipocampo), la intensidad de la expresión de Fos varía dependiendo de la duración, la severidad de la IMO y la región estudiada. Por ejemplo, en la corteza cerebral, la expresión de Fos se incrementa a partir de los 30 min de estrés por IMO, mientras que en la amígdala el incremento se ve 1 hora post-IMO [Mohammad G, et al., 2000 y Briski K, et al., 2001].

Es posible así observar que los marcadores de estrés en el modelo de IMO no sólo responden en el hipotálamo, como un centro regulador de la homeostasis, sino que el metabolismo de distintas moléculas en las regiones del sistema límbico también se ve afectado por las condiciones de estrés.

1.5 Las neuronas peptidérgicas

Se conoce como neuronas a las células que componen el tejido nervioso. Éstas se comunican entre sí a través de un complejo sistema de moléculas, llamadas neurotransmisores, los cuales pueden ser de dos tipos: clásicos y peptidérgicos.

De manera general, se sabe que los neurotransmisores clásicos son procesados y liberados en los axones de las neuronas y, por lo tanto, pueden responder de manera rápida a un incremento en la demanda del neurotransmisor. A diferencia de éstos, los neurotransmisores peptidérgicos son sintetizados en el soma de las neuronas mediante la activación de la maquinaria genética, la cual se encarga de producir una pro-hormona que, posterior a la transcripción, es incorporada en grandes vesículas de secreción, que son transportadas a lo largo del axón, hasta llegar a la terminal nerviosa. Por lo anterior, el soma y las estructuras proximales de las neuronas peptidérgicas contienen una baja concentración del neuropéptido, mientras que en las terminales nerviosas es alta. Un incremento en la cantidad del neuropéptido requiere también del incremento en la expresión genética de la proteína precursora y de producción los demás componentes del sistema (enzimas procesadoras). El procesamiento se lleva a cabo en las vesículas de secreción durante su viaje por el axón hasta la terminal nerviosa donde se encuentra la mayor concentración del péptido maduro; este proceso puede tomar hasta una hora, dependiendo de lo largo del axón [Squire LR, et al., 2003].

Debido a que el tema central de este trabajo se trata del metabolismo de un neuropéptido - el TRH (Hormona Liberadora de Tirotropina) -, en la siguiente sección se hablará del mismo con mayor detalle. La participación del TRH se ha sugerido en algunos estados patológicos del humano, como la depresión clínica y la ansiedad, donde se han encontrado indicadores de una regulación deficiente del eje tiroideo [Nemeroff y Evans 1989; Fosey et al., 1993; Loosen y Orange 1998; Tukul et al., 1999]. Además, se ha propuesto al TRH como una molécula con propiedades ansiolíticas y anti-depresivas [Thomson y Rosen, 2000; Lloyd RL, et al., 2001], de ahí el interés de estudiar este neuropéptido bajo las condiciones de estrés psicológico agudo.

1.6 Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) y el eje Tiroideo (HHT)

La Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH por su nombre en inglés, Thyrotropin Releasing Hormone) es un neuropéptido hipotalámico producido en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) con funciones hipofisiotrópicas y moduladoras. Fue descubierta por su función sobre la adenohipófisis, donde estimula la síntesis y liberación de Tirotropina (TSH), la cual estimula en la tiroides la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4). Las hormonas tiroideas (T_4 y T_3), así como los glucocorticoides, son importantes en el control homeostático de la energía y el metabolismo; la T_3 retroalimenta negativamente al hipotálamo, disminuyendo la síntesis y liberación de TRH y en la adenohipófisis, la síntesis y liberación de TSH (Figura 6).

Además de jugar un papel crucial en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo (HHT), el TRH también influye en la liberación de otras hormonas, incluyendo la prolactina, hormona de crecimiento y vasopresina de la hipófisis [Prokai L, 2002]. A pesar de que este neuropéptido fue aislado originalmente del hipotálamo de mamíferos, se encuentra también en zonas fuera del hipotálamo como la corteza cerebral, el septum, la amígdala, el hipocampo, entre otras [Prokai L, 2002]. El TRH se presenta en todos los cerebros de mamíferos, así como en algunos órganos periféricos.

El papel neuromodulador del TRH en el sistema límbico se ha sustentado con base no sólo en su localización (junto con sus receptores y PPII) sino a los efectos observados en respuesta a su administración *in vivo* [Larsen PR, et al. 2003]. La administración *in vivo* de TRH o de sus análogos induce actividad locomotora [Thomson y Rosen, 2000], revierte daños neuroespinales, actúa como antidepresivo, antiepiléptico, incrementa la vigilancia y reduce la narcosis inducida por etanol ó barbitúricos [Metcalf y Dettmar 1981, Stocca y Nistri 1996; Horita A, 1998; Thomson y Rosen 2000; Gary KA, et al., 2003]. Su administración central disminuye la expresión de miedo condicionado y la respuesta de alarma (*startle*) [Gary KA et al., 2003]. A pesar de la identificación de múltiples efectos por la administración del péptido, los efectos son de muy corta duración, ya que la vida media del TRH es muy baja [Ver en Charli JL, et al. 1998] y, aunque se han sintetizado varios análogos, aún es necesario identificar la especificidad de sus efectos. La mayoría de los trabajos utilizan administración periférica ó, a nivel central, vía el ventrículo lateral; esto impide el reconocimiento de las vías específicas de regiones determinadas que aclaren el papel fisiológico del TRH en cada estructura del sistema límbico.

En el Sistema Nervioso se ha demostrado que el contenido de este neuropéptido puede cambiar hasta 100 veces en respuesta a varios tratamientos experimentales agudos ó crónicos, como los choques electroconvulsivos [Pekary AE, et al., 2000], estimulación por kindling [de Gortari et al., 1995], ingestión de alcohol [de Gortari, et al., 2000] ó los tratamientos neurofarmacológicos [Gary KA, et al. 2003] y la inyección de corticosterona [Pékary AE, et al., 2005].

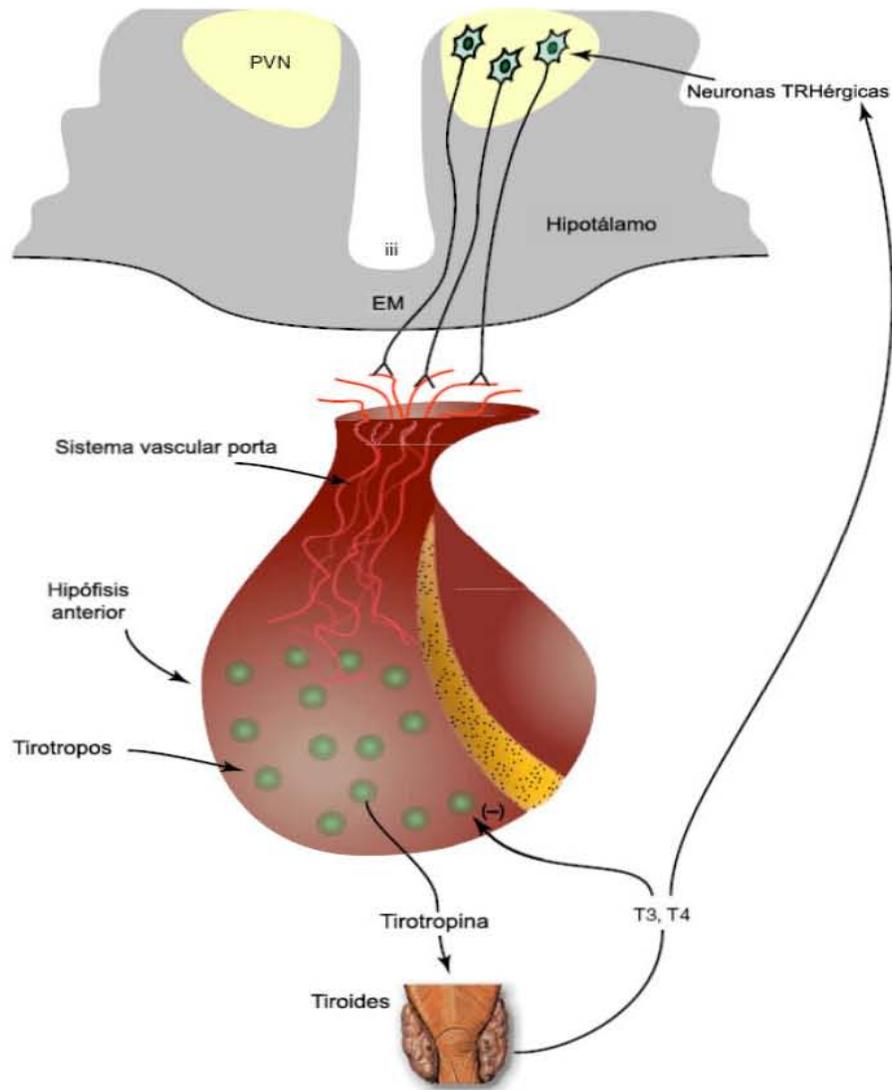


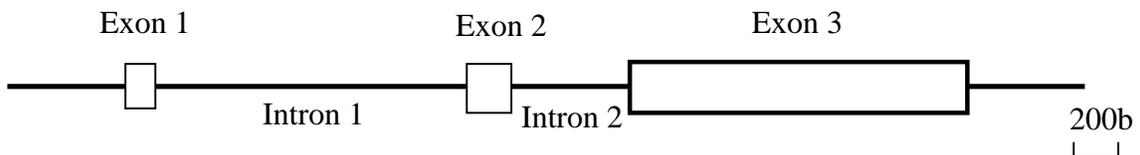
Figura 6. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides
(Tomado de Squire et al., 2003)

El gen del TRH

El gen de TRH ha sido caracterizado en ratas [Lee SI, 1988] y en humanos [Yamada M, 1990], encontrándose una homología del 89.2% en la región que codifica para el TRH. La región codificante en ambos genes presenta tres exones; separadas por dos intrones. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida; el exón 2 para el péptido señal y una porción pequeña del péptido amino terminal, mientras que el exón 3 se encarga de codificar la mayor parte del precursor de TRH (pro-TRH) (Figura 7a).

La región 5' contiene la región promotora, la cual presenta varias secuencias consenso de elementos regulatorios: para el receptor de la hormona tiroidea (TR), dos unidades que unen al TR en su forma monomérica y otra que tiene la capacidad de unir tanto la forma monomérica, como la heterodimérica. Existe también un sitio de unión para el receptor de glucocorticoides (GR), dos elementos de respuesta imperfectos para AMPc, denominados CRE y para los elementos de respuesta al factor de transcripción AP-1 [Lee SI, 1988] (Figura 7b).

Los genes que codifican el prepro-TRH, los receptores del TRH y las enzimas encargadas para la biosíntesis del gen de la TRH contienen elementos de respuesta a los GC [Pekáry AE, 2005]. Así, los GC pueden producir cambios en la expresión de estos genes, los cuales serán de especial interés en este estudio (ver más adelante).



a. Gen de TRH



b. Promotor del TRH

Figura 7. Estructura del gen de TRH (a) y su promotor (b).

Biosíntesis del gen del TRH

Existe sólo un gen responsable de la biosíntesis de TRH en rata; en los roedores codifica para un RNAm cuya traducción genera un precursor, el proTRH, de 26 kD, que contiene 5 copias del precursor inmediato del TRH (denominado TRH-gly: gln-his-pro-gly), separadas del resto de la secuencia por pares de aminoácidos básicos [Ver en Charli JL, 1998], los cuales son segmentados por la actividad de las convertasas PC1 y PC2, seguidas de la acción de la carboxipeptidasa E, que remueve los residuos dibásicos. La secuencia Gln-His-Pro-Gly es transformada por la enzima PAM [Larsen PR, 2003], que la degrada en el extremo carboxi-terminal del Gly dejando el grupo amida en la prolina; la glutaminil ciclasa se encarga de ciclicar el Gln a pGlu, para producir el péptido maduro (pGlu-His-Pro-NH₂) [Prokai L, 2002; Larsen PR, 2003]. Además de TRH, el pro-TRH puede dar lugar al menos a otros 7 péptidos que se encuentran entre las secuencias que codifican para la de TRH. Un ejemplo de éstos péptidos crípticos del gen de TRH es el prepro-TRH-(160-169), el cual es liberado de la eminencia media y transportado por el sistema porta y es capaz de estimular los niveles de RNAm de TSH y Prolactina en líneas celulares hipofisarias (GH3) [Carr FE et al., 1993] La estructura química del TRH está representada en la figura 8.

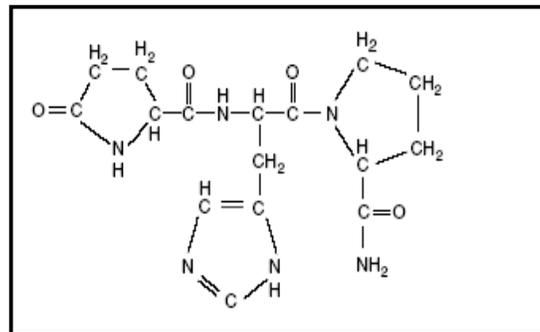


Figura 8. Estructura química del TRH
(Tomado de Squire et al., 2003)

Receptores específicos para el TRH: TRH-R1 y TRH-R2

Hasta ahora, se conocen dos receptores específicos para la TRH el, TRH-R1 y el TRH-R2, los cuales pertenecen a la super-familia de los receptores acoplados a proteínas G, que presentan 7 dominios transmembranales y que transducen las señales extracelulares al interior de la célula [Ferguson SG, et al., 1998].

Los receptores del TRH son capaces de activar la fosfolipasa C, para movilizar el calcio intracelular y activar la vía de señalización de la PKC (Proteína Cinasa C), pero también es capaz de activar la vía de las MAPK (Proteína Cinasa Activada por Mitógeno) en células hipofisarias [Smith J, et al., 2001]. Cuando el TRH se une a sus receptores, se estimula la síntesis y liberación de TSH de los tirotrópos o de Prolactina de los lactotópos; los receptores son internalizados a través de vesículas cubiertas de clatrina, que en su mayoría son endocitadas y recicladas posteriormente (incorporándose a la membrana plasmática nuevamente), mientras que una pequeña fracción de ellas son degradadas por la acción lisosomal y así es posible que la concentración de los receptores en la membrana disminuya (down-regulation) [Joseph-Bravo, et al. 2006].

Aunque no existan diferencias en la afinidad por el TRH, estos receptores son producto de dos genes distintos y se diferencian en su distribución anatómica dentro del Sistema Nervioso. El TRH-R1 de humano tiene una homología del 89.2% con el de la rata a nivel del DNA y del 95% a nivel de la secuencia de los aminoácidos [Sun Y, 2003]. Se encuentra en altas concentraciones en la adenohipófisis y en regiones neuroendócrinas del cerebro, el Sistema Nervioso Autónomo así como en regiones viscerales del tallo cerebral, por lo que se piensa que participa en procesos de transducción de señales neuroendócrinas [Lu X, et al., 2003].

En contraste, el TRH-R2 sólo ha sido descrito en los roedores hasta el momento. Se encuentra ampliamente distribuido en regiones importantes para la transmisión somatosensorial y para las funciones superiores del SNC, tales como: tálamo, corteza cerebral, cerebelo, núcleo medio geniculado, formación reticular, septum, complejo amigdalino basolateral, etc., lo cual ha hecho que se relacione al TRH con funciones de memoria, cognitivas, de actividad locomotora, la percepción del dolor, emociones, entre otras [Prokai L, 2002] por lo que se ha propuesto como mediador de funciones cerebrales superiores y somatosensoriales [Lu X, et al., 2003].

Aparte de la distribución de los receptores, el TRH-R1 y R2 se distinguen por las conformaciones que éstos adquieren y, por lo tanto en los mecanismos de señalización que activan. El TRH-R2 exhibe una actividad de señalización basal y una velocidad de internalización mayor que la del TRH-R1 [Sun Y, et al., 2003].

Recientemente, se han clonado tres receptores acoplados a proteínas G diseñados a partir de las regiones conservadas de las hélices transmembranales del TRH-R1 de mamífero en el tejido cerebral de *Xenopus laevis* [Lu X, et al., 2003]. Entre estas formas clonadas se encuentra un subtipo de receptor novedoso, el xTRHR3, el cual se expresa abundantemente en el cerebro y en bajos niveles en el sistema periférico. Este subtipo presenta muy poca afinidad por el TRH en comparación con los subtipos de receptores R1 y R2 [Lu X, et al., 2003] y ha sido propuesto como un receptor a un péptido distinto al TRH, pero con estructura química similar.

La actividad biológica de las moléculas efectoras depende de su capacidad de unirse a receptores específicos y de los procesos intracelulares que disparan. La regulación del número de receptores y la sensibilidad de los mismos son un factor determinante para la respuesta celular y esto está regulado por la síntesis de los receptores, el procesamiento post-traduccional y la incorporación de los receptores a la membrana plasmática, así como la tasa de desensibilización y de internalización de los receptores que ocurre después de que el ligando interactúa con el receptor.

Estudios *in vitro* en células de adenohipófisis han demostrado que de forma similar a la que ocurre con las vías CRHérgicas, el TRH al unirse a su receptor, activa las vías TRHérgicas y modula los niveles del mensajero de sus receptores, es decir que el TRH es capaz de regular la expresión de su propio receptor [Yu R y Hinkle PM, 1998] (regulación homóloga). Puede también ocurrir una regulación heteróloga, regulada por varias hormonas u otros factores. Por ejemplo en hipófisis, las hormonas tiroideas disminuyen los niveles del mensajero de los receptores, mientras que los estrógenos y los GC incrementan los niveles del RNAm de TRH-R y su densidad, respectivamente [Ver en Bauer K, et al., 1999].

Piroglutamil aminopeptidasa II (PPII)

A diferencia de los neurotransmisores clásicos que son inactivados por sistemas de recaptura rápidos, una característica de los transmisores peptidérgicos, como el TRH, es que son inactivados de forma eficiente por la degradación enzimática; si bien existen mecanismos de recaptura, éstos son muy lentos y no parecen constituir el mecanismo por el cual se da la eliminación, difusión (clearance) de TRH [Ver en Joseph-Bravo, et al., 2006].

En el caso del TRH, la enzima encargada de la inactivación es la Piroglutamil aminopeptidasa II (PPII, EC 3.4.19.6), la cual pertenece a la familia de las metaloproteasas e hidroliza el enlace peptídico piroglutamil-histidil de la TRH en el espacio extracelular. Esta enzima (tanto la actividad como su RNAm) está distribuida principalmente en el Sistema Nervioso Central de forma heterogénea, específicamente en las terminales nerviosas de las neuronas, aunque también se ha encontrado en la adenohipófisis, preferencialmente en los lactotrofos, y en algunos otros órganos, como el bazo y los pulmones. Hasta ahora, se ha demostrado que la distribución del RNAm de la PPII coincide, al menos con uno de los receptores de TRH (R2) [Charli JL, et al., 1998; Heuer et al., 2000].

La PPII es una enzima de 1025 aminoácidos y está presente en las membranas sinaptosomales, en forma de homodímero, presentando un dominio transmembranal corto y un dominio extracelular largo. Esta enzima posee la característica de ser la neuropeptidasa más específica descrita hasta el momento (Km para TRH: 40 μmol), pues presenta requerimientos en su sustrato bastante restringidos [Charli JL, et al., 1998] y, por lo tanto, es posible asumir que la localización de esta enzima puede reflejar los blancos de la actividad del neuropéptido TRH [Heuer H, et al., 2000].

Regulación de las vías TRHérgicas.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la regulación del metabolismo de TRH en el sistema neuroendócrino y más recientemente en el sistema límbico. Como se mencionó, en respuesta a un estímulo neural, como el frío, el eje tiroideo se activa y simultáneamente incrementa la síntesis y liberación del TRH del hipotálamo [Uribe et al., 1991]. En el sistema límbico, se ha observado que la estimulación transináptica como es la del kindling, aumenta los niveles de mRNA de pro-TRH y sus receptores (TRH-R1 y TRH-R2), el contenido del péptido y la enzima inactivante (PPII) en regiones como la amígdala, el hipocampo y la corteza frontal [de Gortari et al., 2006].

Situaciones como el ayuno, inhiben la actividad TRHérgica del hipotálamo y el eje tiroideo así como la expresión de TRH en la amígdala [Blake NG et al., 1991 y de Gortari P et al., 2000]. Como se mencionó en la sección 1.5, cambios en los niveles de RNAm o del péptido ocurren en zonas límbicas en respuesta a estimulación eléctrica (kindling ó electrochoques) y por ingestión aguda o crónica de alcohol. Las regiones responsivas dependen del estímulo; el kindling incrementa la actividad de las zonas epileptogénicas (amígdala, hipocampo, corteza) mientras que el alcohol, afecta blancos específicos como hipocampo, corteza e hipotálamo. La respuesta de la amígdala se ve preferentemente en situaciones de cambios metabólicos que podrían estar relacionados también con situaciones de estrés por hambre. En un intento de distinguir el efecto de ansiedad se estudió en el laboratorio el modelo de enterramiento defensivo, encontrando que las vías TRHérgicas se encuentran inhibidas específicamente en amígdala, mientras que aumentó la síntesis del TRH en el PVN. Cambios específicos en hipocampo se encontraron sólo en un modelo de aprendizaje espacial (el laberinto de agua de Morris) en el cual los animales que aprendieron la tarea mostraron un aumento en los niveles de RNAm de TRH y de TRH-R1. En este modelo se observó un incremento también, a tiempos cortos, en amígdala pero en ambos grupos, el que aprendió la tarea espacial y, los controles de nado [Aguilar-Valles et al., en preparación]; dicho aumento coincidió con una inhibición en la expresión de CRH [Aguilar-Valles et al., 2006], sugiriendo un posible papel inhibitorio del TRH amigdalino sobre la ansiedad. Esto ha sido demostrado mediante la administración intracerebroventricular de TRH que disminuye los parámetros de ansiedad en el modelo de enterramiento defensivo [Gutiérrez Mariscal, 2002 y 2005].

Se ha utilizado el modelo de estrés por IMO (tiempos prolongados de IMO, 2h) y su efecto en el eje tiroideo; la expresión del mRNA de TRH en el PVN disminuyen de manera determinante en ratas machos F344 [Cizza G, 1995 y 1996] y disminuyen la TSH circulante y las hormonas tiroideas [Simpkins JW, et al., 1978].

2. Justificación

Hasta ahora los modelos animales estudiados en nuestro laboratorio mostraban componentes de la respuesta adrenal en conjunto con otros procesos (metabólicos, de aprendizaje, de ansiedad, entre otros). En estas condiciones la respuesta al estrés está presente, sin embargo además del estrés existen otros estímulos asociados a los cuales el metabolismo de TRH puede estar alterado. Por ejemplo en ayuno las alteraciones metabólicas; en el enterramiento defensivo los choques eléctricos como factor físico aversivo y el aprendizaje producido por el mismo. Por lo anterior es importante definir si el sistema TRHérgico del sistema límbico se activa en un modelo que permita estudiar exclusivamente el efecto del estrés psicológico y no en combinación con otros factores, como los mencionados.

El modelo de estudio presentado en este trabajo permitirá definir si la función de las vías TRHérgicas del sistema límbico, como ocurre con las del PVN, son afectadas por el estrés agudo en los roedores, lo cual nos permitirá avanzar en el conocimiento de los factores involucrados en la regulación del metabolismo del TRH en condiciones de estrés psicológico [Joseph Bravo P, 2005]. Los resultados obtenidos permitirán explicar algunos de los efectos del TRH administrado exógenamente como el de antidepresivo o ansiolítico, particularmente en la época actual, donde cada vez se conocen más patologías humanas relacionadas con el estado de estrés.

3. Hipótesis

Con base en los antecedentes anteriores donde se demuestra que en respuesta a un estímulo neural hay cambios en el contenido del TRH, su biosíntesis y/o la expresión de sus receptores, se postula que cambios en alguna de estas variables, en las regiones del sistema límbico estudiadas, en respuesta al estrés psicológico agudo nos permitirán proponer la participación de las vías TRHérgicas en este tipo de estrés. Nos permitirá además distinguir, con base en las áreas responsivas, de otros efectos que presenta el TRH administrado, como son el aumento en la vigilia o locomoción [Thompson y Rosen, 2000].

4. Objetivos

Si bien se ha reconocido el papel del TRH en modular el metabolismo energético, poco se sabe sobre la regulación de este neuropéptido en condiciones de estrés psicológico. El objetivo del presente proyecto es definir si el estrés psicológico agudo modifica el metabolismo de TRH en las neuronas del sistema límbico. La respuesta del eje tiroideo será evaluada cuantificando los niveles de tirotropina sérica y de TRH y su RNAm en hipotálamo; el péptido y la expresión de TRH y sus receptores serán analizados en amígdala, corteza frontal, hipocampo, hipotálamo, n. accumbens y septum. Como un control de la respuesta adecuada de los animales sometidos al paradigma de inmovilización, se evaluarán los niveles de corticosterona y la expresión de RNAm de GR, de CRH y de CRH-R1 en algunas de las regiones estudiadas, como el hipotálamo y la amígdala.

5. Materiales y Métodos

Animales y modelo experimental

Ratas Wistar macho adultas, (250-340 g) se mantuvieron en grupos de 4, dentro de cajas de acrílico en el bioterio del Instituto de Biotecnología UNAM, con ciclos de luz-obscuridad de 12 horas (periodos de luz de 7 am a 7 pm) y acceso *ad libitum* a comida y agua.

El procedimiento se llevó a cabo dentro de las instalaciones del mismo bioterio, comenzando a las 8:30 am y terminando aproximadamente a las 11 am en cada una de las réplicas (3) del experimento. Las ratas fueron sometidas a la prueba de estrés psicológico agudo dentro de tubos de acrílico transparente, tal como es planteado por Ginsberg [Ginsberg AB, et al., 2003]. Los tiempos de inmovilización y decapitación de las ratas fueron determinados con base en el trabajo de Paskitti, et al. , ya que establece evidencias donde los picos máximos de Corticosterona y ACTH séricas se producen a los 30 min de estrés agudo por inmovilización en tubos de acrílico, las cuales disminuyen aproximadamente 2h posteriores al estrés; se detectó un pico máximo en el hnRNA del receptor de glucocorticoides (GR) en PVN e hipocampo, 30 min después del tratamiento por inmovilización [Paskitti ME, et al., 2000].

Grupos experimentales

Para este proyecto se propusieron 3 grupos experimentales, que en cada una de las réplicas del experimento tuvo una n=6:

- A) Grupo control: este grupo no fue sometido a la prueba de estrés, sino que permaneció en las cajas y estantes del bioterio sin ser manipulado, hasta el momento de la decapitación, el cual ocurrió entre los tiempos de sacrificio del grupo G15 y G45.
- B) Grupo G15: este grupo fue sometido a la prueba de estrés agudo durante 30 minutos y regresado a su caja de acrílico, para ser sacrificado por decapitación 15 minutos posteriores a la prueba de inmovilización.
- C) Grupo G45: este grupo fue sometido a la prueba de estrés agudo durante 30 minutos y regresado a su caja de acrílico, para ser sacrificado por decapitación 45 minutos posteriores a la prueba de inmovilización.

Muestras de plasma

Luego del sacrificio por decapitación, se colectó la sangre. Una vez coagulada, fue centrifugada a 3000 rpm durante 20 minutos, para así obtener el suero, el cual fue almacenado a -20°C, para ser posteriormente utilizado para realizar el radioinmunoensayo de Corticosterona y de TSH.

Disecciones cerebrales

Los cerebros extraídos fueron colocados sobre bloques de hielo seco y almacenados a -70°C en un ultracongelador. Con base en el atlas de Paxinos y Watson [Paxinos G y Watson C, 1998] y los mapas de microdissección de cerebro de rata de Palkovits [Palkovits M y Brownstein MJ, 1988], se disecaron los cerebros sobre hielo seco, obteniendo las siguientes estructuras: amígdala, corteza frontal, hipocampo anterior y posterior, hipotálamo (superior y mediobasal) núcleo accumbens y septum. Los lados derecho e izquierdo de cada región fueron almacenados por separado en tubos eppendorf de 1.5 ml a -70°C . El lado izquierdo de los cortes (excepto para hipotálamo, que se utilizó la porción Mediobasal) se utilizó para medir la concentración de TRH en el tejido por RIA, mientras que el lado derecho se utilizó para la semicuantificación de RNAm por RT-PCR (excepto para el hipotálamo, que se utilizó la porción superior del mismo). En la tabla siguiente se indican los bregmas que sirvieron de referencia para realizar los cortes de cada una de las regiones de interés:

Región	Bregmas	Estructuras incluidas en el corte
Hipotálamo Superior (ó dorsal) y Medio basal	Entre -2.12 y -2.80mm	H. Superior: Núcleos oaraventricular, dorsomedial, y ventromedial. Eminencia Media y parte de los Núcleos Arcuatos
Amígdala	Entre -2.12 y -2.80 mm	Núcleos amigdalinos Medial, Central, Basolateral y Corteza Piriforme.
Corteza frontal	Entre -4.2 y -3.20 mm	
Núcleo Accumbens	Entre -2.7 y -1.7 mm	Porciones medial y lateral de esta región
Septum	Entre -1.20 y 0mm	Núcleos dorsal, medial y lateral de esta estructura
Hipocampo Anterior	Entre -2.12 y -3.14 mm	CA1, CA2, CA3 y CA4 de esta estructura
Hipocampo Posterior	Entre -4.80 y -5.80mm	CA1, CA2, CA3, CA4 y Giro dentado de esta estructura.

Determinaciones bioquímicas

1. Extracción de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)

El tejido obtenido de cada una de las regiones fue sonicado en 500µl de ácido acético al 20%. De este homogenizado total, se tomaron alícuotas de 50 µl que se utilizaron después para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry (ver más adelante). El resto del volumen fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos, a 4° C y se obtuvieron 420 µl del sobrenadante, al cual se le agregaron 800 µl de metanol absoluto y se agitó para dejarlo reposar durante 12 horas a -20° C.

Las muestras se volvieron a centrifugar a 10 000 rpm durante 15 minutos a 4° C, se obtuvo el sobrenadante por decantación y se evaporó a sequedad en un concentrador por vacío con una trampa de condensación refrigerada [Speed VAc Concentrator Savant]. El sedimento obtenido se almacena a -20° C para la cuantificación de TRH por radioinmunoensayo.

2. Radioinmunoensayo (RIA) de TRH

Las pruebas de radioinmunoensayo se basan en la competencia entre las moléculas de la hormona marcada con material radiactivo [¹²⁵I y ³H, en este caso] y las moléculas no marcadas, por un número limitado de sitios de unión en anticuerpos específicos para las hormonas (anti-corticosterona, anti-TSH y anti-TRH, en este estudio). Si permitimos que una cantidad fija de la hormona marcada reaccione con el anticuerpo, entonces la cantidad de la hormona marcada unida al anticuerpo, será inversamente proporcional a la concentración del ligando sin marcar. La radiactividad en el precipitado permite construir una curva estándar contra la cual se evalúan los valores de radiactividad de las muestras [Mathews CK, 1998 y Bolton AE, 1977].

El anticuerpo anti-TRH y las condiciones del ensayo ya han sido previamente optimizadas [Joseph-Bravo P, 1979 y Méndez M, 1987]. El TRH fue iodinado y purificado por el QFB. Miguel Cisneros, en el laboratorio de la Dra. Joseph-Bravo, utilizando el método de Cloramina T, I¹²⁵ [Perkin Elmer] y una columna de Sephadex de 10 ml (20 cm de largo y 0.8 cm de diámetro).

Los sedimentos del extracto de TRH fueron resuspendidos en distintos volúmenes de buffer de RIA (ver anexo), dependiendo de la región: 1500 µl para el Hipotálamo Mediobasal, el cual incluye a la eminencia media, y 250 µl para las demás regiones. El ensayo se realiza en tubos de vidrio [12x75 mm VWR Scientific].

Preparación de la mezcla de incubación: se tomaron 100 µl del resuspendido de cada una de las muestras, por duplicado, a los que se añadió 100 µl del anticuerpo anti-TRH (R₂) (dilución 1:10 000) y 100 µl del [I¹²⁵] TRH.

Preparación de la curva estándar de TRH [Sigma]: Se añadió alícuotas de TRH (por triplicado) que contenían 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg de TRH en 100 µl de buffer de RIA, 100 µl del anticuerpo anti-TRH (R₂) y 100 µl del I¹²⁵ TRH. Ver figura 6.

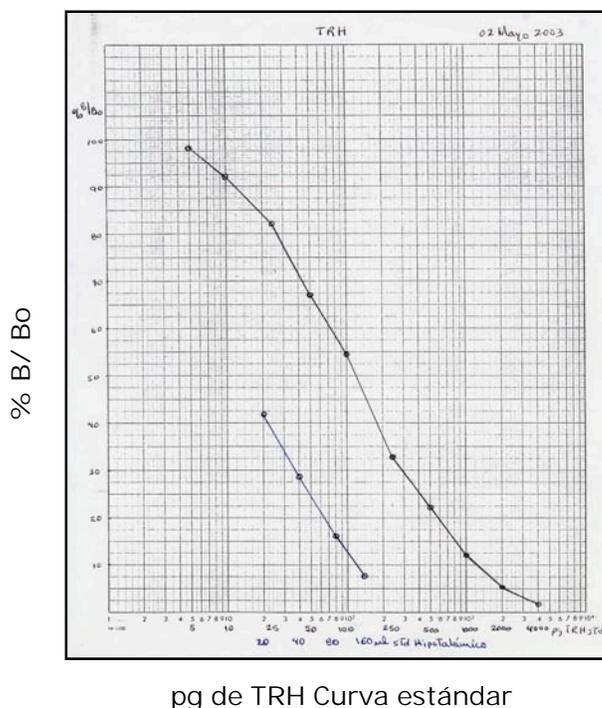


Figura 6. Gráfica representativa de una curva estándar del RIA de TRH. En el eje "y" se grafican los porcentajes de B/Bo y en el "x" el Log de la concentración de TRH en pg. La curva en forma sigmoide muestra el desplazamiento del TRH marcado por concentraciones crecientes del TRH frío. La línea paralela a la curva estándar corresponde al estándar interno, el cual es un control que se utiliza para corroborar el desplazamiento de la marca y para comparar un ensayo con otro.

Preparación del estándar interno: A tubos de vidrio (por triplicado) conteniendo 20, 40, 80 ó 160 μ l de extracto hipotalámico de rata (que fueron evaporados a sequedad y resuspendidos en 100 μ l de buffer de RIA), se les agregó 100 μ l del anticuerpo anti-TRH (R_2) y 100 μ l del I^{125} TRH. La variación entre los diferentes estándares internos fue del 15%.

Preparación de tubos de pegado inespecífico (NSB, unión inespecífica de la TRH en ausencia de anticuerpos): se tomaron tubos de vidrio por triplicado y se adicionaron 200 μ l de buffer de RIA y 100 μ l del I^{125} TRH.

Preparación de tubos de Bo (unión entre el TRH marcado y el anticuerpo en ausencia de TRH frío): se tomaron los tubos de vidrio por triplicado y se agregaron 100 μ l de buffer de RIA, 100 μ l del anticuerpo anti-TRH (R_2) y 100 μ l del I^{125} TRH.

Preparación de los totales (T): sólo contenían 100 μ l del I^{125} TRH.

Una vez preparados cada uno de los tubos, se mezclaron e incubaron a 4° C durante 48 horas. Pasado este tiempo, se añadió 1ml de etanol frío, se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos y se

aspiró el sobrenadante. Los tubos que contenían el precipitado se contaron y se registraron las cuentas por minuto (cpm), en un aparato de conteo de radiaciones gamma [LKB Wallace Miligamma Counter].

Los valores de cpm se transforman en picogramos (pg) de TRH con ayuda de un "software" de transformación matemática ("enri") que realiza una transformación logit-log y posteriormente una regresión lineal [Odell WD, 1971].

$$\text{Logit } B/B_0 = \text{Ln} [(B/B_0) / (1-B/B_0)]$$

Donde:

B= cpm en muestras de concentración de TRH desconocida

B₀= cpm a concentración de TRH =0 (NSB)

Los RIA's tuvieron una variación intra e interensayo del 15%, así como una sensibilidad de 20 pg. Estos resultados también se expresan en valores de concentración al relacionarlos con los valores de proteínas totales obtenidos por el Método de Lowry (TRH / mg proteína).

3. Radioinmunoensayo de Tirotropina (TSH)

Se prepararon por triplicado los tubos de la curva estándar y los controles, los cuales contenían lo siguiente:

- A) Totales: 100 µl de la hormona marcada.
- B) Tubos de NSB: 300 µl de buffer de RIA (ver anexo).
- C) Tubos de B₀: 200 µl de buffer de RIA, 100 µl del anticuerpo anti-TSH [NIDDK], con una dilución de 1:37 500 en buffer de RIA.
- D) Tubos de Curva Estándar de TSH [NIDDK]: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg de TSH en 200 µl de buffer de RIA, además de 100 µl de anticuerpo anti-TSH (1:37 500).
- E) Tubos de las muestras: por duplicado, 50 µl de suero, 150 µl de buffer de RIA y 100 µl de anticuerpo anti-TSH (1:37 500).

Una vez preparados los tubos, se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 24 horas y se adicionaron a todos los tubos 100 µl de I¹²⁵ TSH, equivalentes a 10 000 cpm dejándolos incubar nuevamente por 24 horas.

Para la separación del antígeno libre del unido al anticuerpo, se adicionaron 100 µl de suero de cabra anti IgG de conejo al 2.5% en PBS y 100 µl de suero normal de conejo al 2% en PBS y se

dejó reposar por 2 horas, luego de las cuales se agregó 1 ml de polietilenlicol al 4% en PBS y se centrifugaron a 4500 rpm durante 30 minutos. Se aspiró el sobrenadante y los tubos con el sedimento se contaron [cuentas por minuto (cpm)] en el aparato de conteo de radiaciones gamma [LKB Wallace Miligamma Counter].

Para calcular la concentración de TSH en las muestras se ocupó también el software "enri".

4. Radioinmunoensayo de Corticosterona (CORT)

Para la preparación de las muestras se hizo una dilución de los sueros 1:500 en buffer de RIA (ver anexo), tomando 4 µl de las muestras de suero y 2 ml de buffer. Los tubos de suero diluidos se pusieron en un baño de agua a 98° C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se tomó por duplicado 500 µl del suero diluido, al cual se le añadió 100 µl de anticuerpo anti-CORT [ICN Farmaceutica], con una dilución de 1:1200 y 100 µl de ³H-CORT [ICN Farmaceutica], equivalentes a 10 000 cpm.

Para la preparación de la curva estándar y los controles, se tomaron por triplicado tubos de vidrio, los cuales contenían lo siguiente:

- A) Totales: 800 µl de buffer y 100 µl de ³H- CORT.
- B) Tubos de NSB: 600 µl de buffer y 100 µl de ³H- CORT.
- C) Tubos de Bo: 500 µl de buffer, 100 µl de anticuerpo anti-CORT y 100 µl de ³H- CORT.
- D) Tubos de Curva Estándar de TSH [NIDDK]: 500 µl de CORT [ICN Farmaceutica] en concentraciones de 5, 10, 25, 50,100, 250, 500, 1000 y 2000 pg en 50 µl de buffer. También se les añadió 100 µl de anticuerpo anti-CORT y 100 µl de ³H- CORT.

Todos los tubos se dejaron incubar a 4° C durante 24 horas y después se agregaron 200µl de Carbon-Dextran [ICN Farmaceutica], excepto a los totales, para la separación del antígeno libre del unido al anticuerpo. Se agitaron y se dejaron incubar por 20 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 minutos y se transfirió el sobrenadante a viales para conteo de radiaciones Beta. Se adicionaron 4 ml de líquido de centelleo [Ecolite de ICN] y se pusieron en un aparato contador de radiaciones Beta [Beckman].

Para calcular la concentración de CORT en las muestras se ocupó el software "enri".

5. Cuantificación de proteínas totales por el Método de Lowry [Lowry OH, 1951]

Preparación de las muestras Se tomaron las alícuotas del homogenizado a las que se les añadieron 50 µl de NaOH 4.5 N y se dejaron hidrolizar a temperatura ambiente durante 12 horas.

Pasado este tiempo, se centrifugaron a velocidad máxima por 1 minuto y se tomaron alícuotas por duplicado, para la corteza y el hipocampo 10 µl y para las demás regiones 20 µl. Este volumen se completó a 200 µl con NaOH 0.5 N.

Preparación de la curva estándar: se prepararon 8 tubos, cada uno con cantidades crecientes de albúmina sérica bovina (BSA; 1 mg/ml): 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µl, volumen que fue completado a 200 µl con agua bidestilada. Posteriormente, se añadieron 100 µl de NaOH 1 N.

A todos los tubos se les añadieron 900µl de Solución E (ver anexo), se agitaron y se dejaron incubar 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 100 µl de Folin 1N (1:1), se agitó nuevamente y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos, para después ser leídos en el espectrofotómetro [Beckman DU 650] a 780 nm, estos valores se ocuparon para calcular la cantidad de proteína de los homogenados utilizados.

6. Extracción de RNA total por el método de Tiocinato de Guanidina [Chomczynski P, 1987]

Todo el material utilizado fue esterilizado previamente en autoclave por 40 minutos, a 121° C. Las soluciones fueron preparadas con agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) (ver anexo) y esterilizadas.

ETAPA I

Se tomaron las partes derechas de los tejidos disecados (a excepción del PVN que se tomó completo) y sonicaron [Sonios Vibra Cell Ultrasonic Procesor] en tubos de microcentrífuga con 0.05 ml/ g de solución desnaturalizante, denominada Solución D (ver anexo). El vástago del sonicador se enjuagó entre grupo y grupo con Sodio Dodecil Sulfato (SDS) 0.02%, etanol absoluto y agua de DEPC y los tubos se mantenían a 4° C todo el tiempo.

Al homogenado se le agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 2M, pH 4 y se agitó vigorosamente. También se agregó un volumen de fenol frío saturado en agua y se agitó vigorosamente, para añadir posteriormente cloroformo isoamílico 49:1 y agitar hasta que las muestras adquirían una apariencia lechosa.

Debido a que los volúmenes de las soluciones variaban dependiendo de la región, resumo en la siguiente tabla los microlitros (µl) que se utilizaron para cada región:

	Hipotálamo superior	Núcleo Accumbens y Septum	Corteza Frontal, Amígdala e Hipocampo.
--	---------------------	---------------------------	--

Solución D	200	150	500
Acetato de Sodio	20	15	50
Fenol	200	150	500
Cloroformo isoamílico	40	30	100

Los tubos se dejaron reposar en hielo durante 15 minutos y, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm [Jouan MR1822, con rotor de 74 mm] durante 20 minutos a 4° C. Luego de centrifugar, se recuperaba la fase acuosa de los tubos cuantificando el volumen y se le añadía un volumen igual de isopropanol; se agitaron y almacenaron a -20° C toda la noche.

ETAPA II

Se centrifugaron los tubos a 14 000 rpm durante 20 minutos a 4° C y se decantó el sobrenadante cuidadosamente. La pastilla se resuspendió en 1/3 del volumen de homogenado inicial en Solución D y se agregó el mismo volumen de isopropanol. Los volúmenes utilizados fueron los siguientes: 66 µl para el Hipotálamo, 50 µl para el núcleo accumbens y el septum y 166.6 µl para la corteza frontal, la amígdala y el hipocampo. Los tubos se agitaron bien y se mantuvieron a -20° C durante una hora. Pasado este tiempo, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4° C y el sobrenadante se decantó cuidadosamente, tratando de eliminar todo el isopropanol del tubo. Se lavó el sedimento con 250 µl de etanol al 75% y se centrifugó durante 12 minutos a 14 000 rpm a 4° C y se decantó como se describió anteriormente. La pastilla fue resuspendida en agua tratada con DEPC recién autoclaveada con los siguientes volúmenes: corteza frontal, amígdala e hipocampo, 50 µl; hipotálamo 50 µl y núcleo accumbens; septum 20 µl. A este volumen se le agregó 1/10 de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló y se dejó precipitando toda la noche a -20° C.

ETAPA III

Se centrifugaron los tubos a 14 000 rpm durante 30 minutos a 4° C, se decantó cuidadosamente y se eliminó el etanol depositado en las paredes del tubo, con cuidado de no tocar la pastilla. A continuación se agregaron 250 µl de etanol al 75% y se centrifugó a 14 000 rpm durante 12 minutos, para decantar nuevamente y eliminar el etanol. Estos lavados se repitieron dos veces consecutivas y, posteriormente, las muestras se secaron en un concentrador por vacío con una trampa de condensación refrigerada [Speed VAc Concentrator Savant] durante 2 minutos, para después resuspenderse en agua tratada con DEPC recién autoclaveada, en 100 µl para: corteza frontal, hipocampo y amígdala; 50 µl para hipotálamo y núcleo accumbens y 20 µl para septum.

Una vez resuspendidas las muestras, se diluyeron (2.5 µl del resuspendido en 500 µl de agua bidestilada estéril), para ser leídas en el espectrofotómetro [Eppendorf BioPhotometer]. Se tomaron las lecturas a 230, 260 y 280 nm y, si las relaciones 260/230, 260/280 eran mayores a 1.5, entonces se realizaban los cálculos para cuantificar el RNA y obtener alícuotas por triplicado que contuvieran 1 µg de RNA en 12 µl de agua tratada con DEPC (tomando en cuenta la DO a 260 nm x factor de dilución x 40 /1000 = µg de RNA /µl). Éstas fueron almacenadas a -70° C para posteriormente ser procesadas por RT-PCR.

Si las relaciones 260/230, 260/280 eran menores a 1.5, se agregaba 1/10 del volumen de resuspensión de acetato de sodio y dos volúmenes de etanol absoluto, para volver a agitar, precipitar a -20° C y lavar la pastilla con etanol al 75%, tal como se describió anteriormente.

7. RT-PCR

La reacción de la transcriptasa reversa (RT) seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un proceso semi-cuantitativo de un RNA específico presente en una muestra y se compara contra la señal de un gen control (en este caso, ciclofilina). Este procedimiento consta de dos etapas: la primera donde se prepara cDNA con la enzima transcriptasa reversa (a partir del RNA total extraído de cada región cerebral) y la segunda, donde se amplifica por PCR la secuencia (mediante la actividad de la taq polimerasa), utilizando oligonucleótidos específicos para el RNAm de interés.

A) Retro-Transcripción

Las alícuotas de 1 µg de RNA total se incubaron por 5 minutos a 65° C y se les dio un pulso en la centrífuga, para así agregar 20 µl de la mezcla de reacción (ver anexo) y dejar incubando durante 2 horas a 37° C. El cDNA podía procesarse de manera inmediata para realizar PCR ó podían ser almacenadas a -20° C.

B) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se tomaron 6 µl de cDNA para CRH, TRH, TRH-R1 y TRH-R2 ó 4 µl de cDNA para ciclofilina y se les añadió 44 µl ó 46 µl de mezcla de reacción (ver anexo), respectivamente.

Las muestras se introdujeron en un termociclador [Eppendorf MasterCycler Gradient] para amplificar los oligonucleótidos de interés (pro-TRH, pro-CRH, ciclofilina, CRH-R1, TRH-R1 y TRH-R2; para ver sus secuencias ver anexo). Para cada región las PCR's se llevaron a cabo en distintas condiciones, por lo que éstas se ven resumidas en las siguientes tablas:

Abreviaciones:

C: Corteza frontal
 B: Núcleo Accumbens
 F: Septum
 D: Amígdala

A: Hipotálamo Superior (contiene al PVN)
 G: Hipocampo Anterior
 E: Hipocampo Posterior
 ND: No determinado

Oligonucleótido: TRH, CRH

Programa: 1´ a 94° C, 1´ a 64° C, 1´15´´ a 72° C y un periodo de extensión de 15´ a 72° C.

TM: 64° C

No. ciclos	C	B	F	D	A	G	E
TRH	30	28	28	30	25	30	29
CRH	29	29	29	30	29	30	30

Oligonucleótido: TRH-R1 y Ciclofilina

Programa: 1´ a 94° C, 1´ a 64° C, 1´15´´ a 72° C y un periodo de extensión de 15´ a 72° C.

TM: 64° C, para G y E 67°C.

No. Ciclos	C	B	F	D	A	G	E
TRH-R1	34	33	33	33	34	36	32
Ciclofilina	22	22	22	22	22	22	22

Oligonucleótido: TRH-R2

Programa: 1´ a 94° C, 1´ a 73° C, 1´15´´ a 72° C y un periodo de extensión de 15´ a 72° C.

TM: 73° C para C, B, F y A; 67° C para D y G.

	C	B	F	A	D	G	E
No. Ciclos	31	32	32	30	34	33	X

Oligonucleótido: CRH-R1, GR y PPII

Programa CRH-R1: 2´ a 95° C, 1:15´ a 95° C, 1´ a 57° C, 1´ a 72° C y un periodo de extensión de 15´ a 72° C.

Programa GR: a 94° C, 1´ a 64° C, 1´15´´ a 72° C y un periodo de extensión de 15´ a 72° C.

Programa PPII: 2´ a 95° C, 1:15´ a 95° C, 1´ a 58° C, 1´ a 72° C y un periodo de extensión de 15´ a 72° C.

TM: 57° C para CRH-R1, 64° C para GR y 58° C para PPII

No. ciclos	C	B	F	D	A	G	E
CRH-R1	ND	ND	ND	32	32	ND	ND
GR	27	ND	ND	30	29	31	31
PPII	31	ND	ND	32	32	ND	ND

8. Semi-cuantificación de RNAm

Se realizaron geles de agarosa al 2% para los distintos amplificados de cada región. Estos geles fueron cargados con las muestras de los amplificados (10 μ l de oligos de TRH, CRH, TRH-R1, TRH-R2, GR, CRH-R1 + 4 μ l de ciclofilina + 2.5 μ l de colorante azul de bromofenol y xylol cyanol [Sigma]) y con marcador de peso molecular DNA Molecular Weight Marker IV 0.07-19.3 kbp. Las muestras se dejaron correr en cámaras de electroforesis con buffer TBE (Tris base, Boric Acid y EDTA, Ver anexo) 0.5 X, durante aproximadamente 1 hora y media a 110 V.

Los geles fueron teñidos en una solución de bromuro de etidio al 0.006 % durante 10 minutos en un agitador y enjuagados con agua destilada en una charola que permaneció en agitación por 15 minutos.

Finalmente, los geles fueron digitalizados en un analizador de imágenes [BioRad Multianalyst], el cual analiza la densidad de las bandas del fragmento de DNA amplificado, teñido con bromuro de etidio e iluminado con luz ultravioleta y las transforma en unidades de densidad. Los valores de las bandas de DNA de TRH, CRH, TRH-R1 y TRH-R2 fueron relacionados con los de ciclofilina, para obtener unidades arbitrarias, comparables entre sí, las cuales fueron graficadas y analizadas.

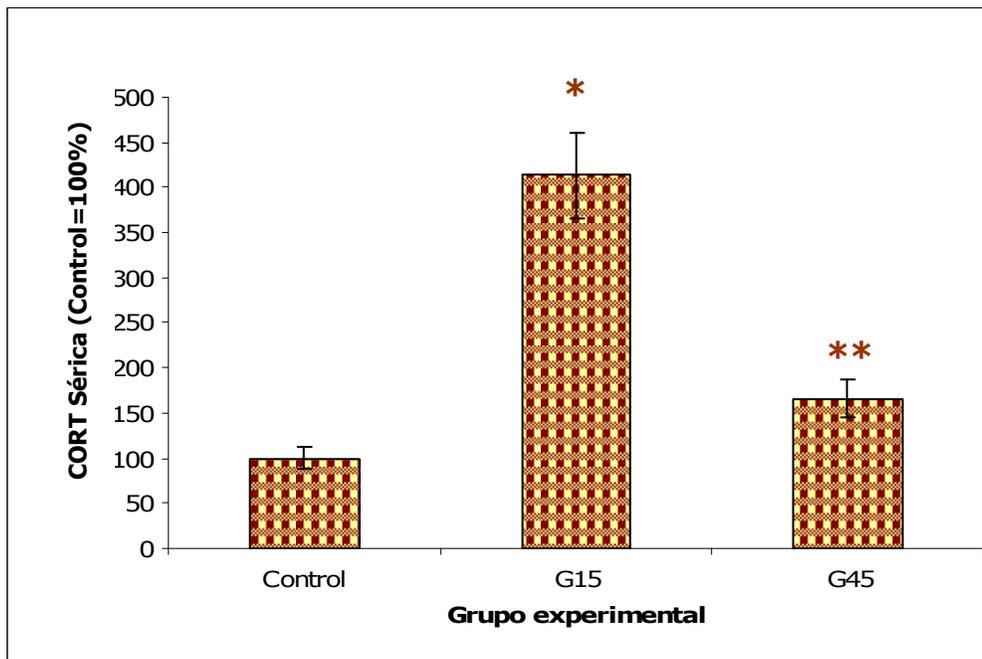
Análisis estadísticos

Los datos obtenidos mediante los procesos anteriormente descritos fueron analizados con análisis de varianza (ANOVA) de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, con ayuda del software StatView. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

6. Resultados

1. Corticosterona sérica

El aumento en la concentración de corticosterona se reconoce como una respuesta fisiológica a cualquier tipo de estrés. En este modelo se observó un aumento de casi 3 veces en la concentración de esta hormona en el grupo G15 ($p < 0.05$), con respecto a los controles. Los niveles basales de la hormona son recuperados en el grupo G45 (Gráfica 1).

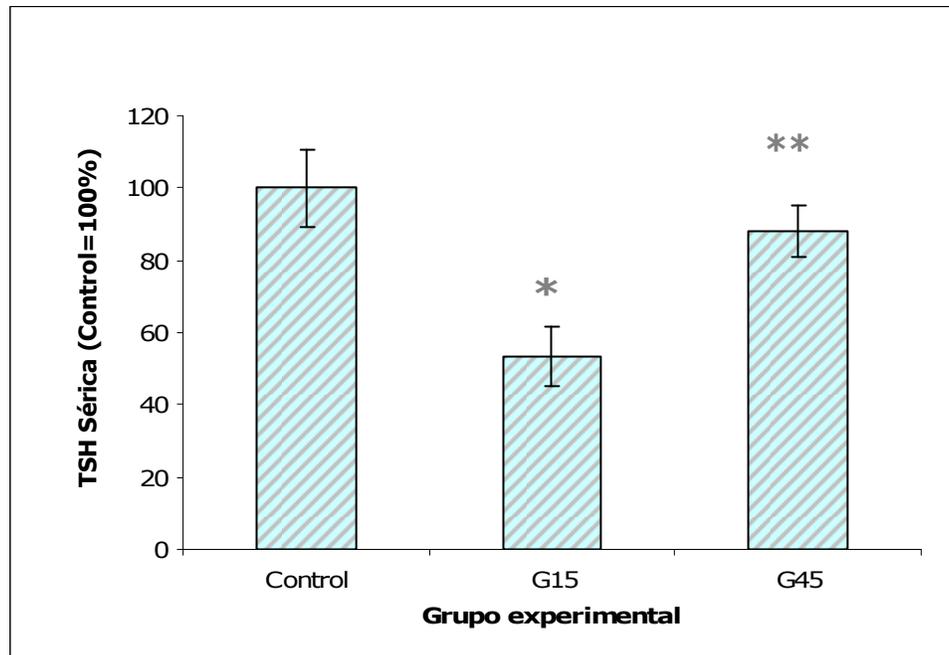


Gráfica 1. Cambios en los niveles de Corticosterona sérica en respuesta a estrés psicológico agudo. Ratas Wistar macho ($n = 18$) fueron sometidas a una prueba de estrés agudo durante 30 minutos y sacrificadas a los 15 (G15) y 45 (G45) minutos posteriores a la prueba. La concentración de corticosterona fue medida por RIA en el suero. Los histogramas representan la media \pm ESM y los resultados se expresan en porcentajes del control (control = 229.9 ± 36.6 ng/ml). Se consideró significancia estadística con $p < 0.05$ (indicado con * vs control y ** VS G45).

2. Tirotropina Sérica

El nivel de TSH circulante disminuyó significativamente en el grupo G15 (43%, $p < 0.05$) con respecto a los controles; sin embargo, este cambio fue transitorio, pues se observa una tendencia a recuperar el nivel basal al sacrificar a los animales 45 minutos post-IMO (Gráfica 2).

La inhibición en el eje tiroideo ha sido previamente reportada en animales sometidos por dos horas a esta prueba en paradigmas de estrés prolongado [Cizza G, 1995 y 1996].



Gráfica 2. Cambios en el nivel de Tirotropina sérica en respuesta al estrés psicológico agudo. El suero de los animales descritos en la Graf. 1 se utilizó para la cuantificación de tirotropina por RIA. Los histogramas representan la media \pm ESM de los valores de TSH en suero expresados porcentajes con respecto al grupo control (intacto) (control=5.7 \pm 1.1 ng/ml, n= 18). * VS Control y ** VS G45, p<0.05.

3. Efecto del estrés psicológico agudo sobre la concentración de TRH y su RNAm, el RNAm de los receptores de TRH y el RNAm de CRH en el sistema límbico.

El cerebro fue disecado en cada una de las regiones, que fueron almacenadas en tubos individuales manteniendo por separado el lado izquierdo del derecho; a excepción del hipotálamo, en el que se separó la región mediobasal conteniendo la eminencia media y la superior que contiene el núcleo paraventricular. En el experimento 1, se cuantificó el TRH del hemisferio izquierdo y del derecho. Por problemas técnicos se perdieron algunas muestras del hemisferio. En los experimentos 2 y 3, se cuantificó TRH en el hemisferio izquierdo y RNAm en el derecho.

Hipotálamo Mediobasal y Superior

- Contenido tisular de TRH y su RNAm

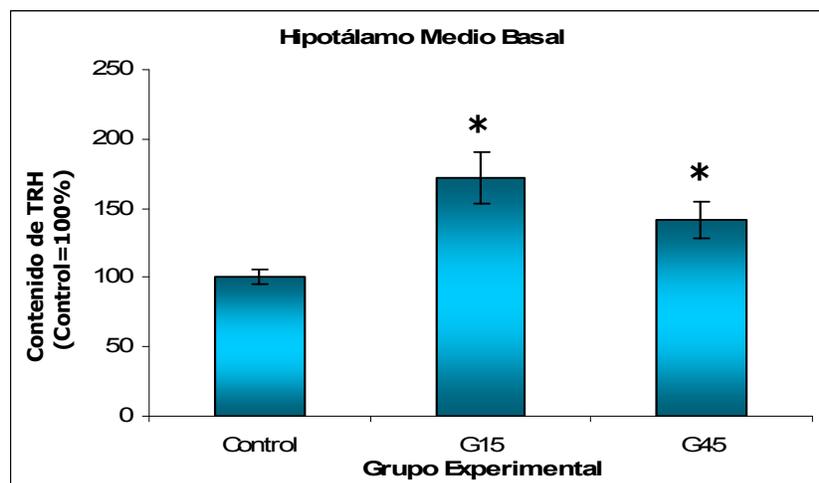
El contenido del péptido en el hipotálamo medio basal mostró un aumento sostenido en el grupo G15, en comparación con los controles (72.6%, $p < 0.05$) y G45 (41.4% $p < 0.05$) (Gráfica 3). Los niveles del RNAm de pro-TRH en el hipotálamo dorsal disminuyeron en ambos grupos experimentales; en el grupo G15 53% ($p < 0.05$) y en el G45 35% ($p < 0.05$) (Gráfica 4).

Los niveles del RNAm del receptor TRH-R1 también disminuyeron en los dos grupos experimentales (G15:75% y G45: 80%, $p < 0.05$), mientras que los del TRH-R2 no mostraron cambios estadísticamente significativos (Gráfica 4).

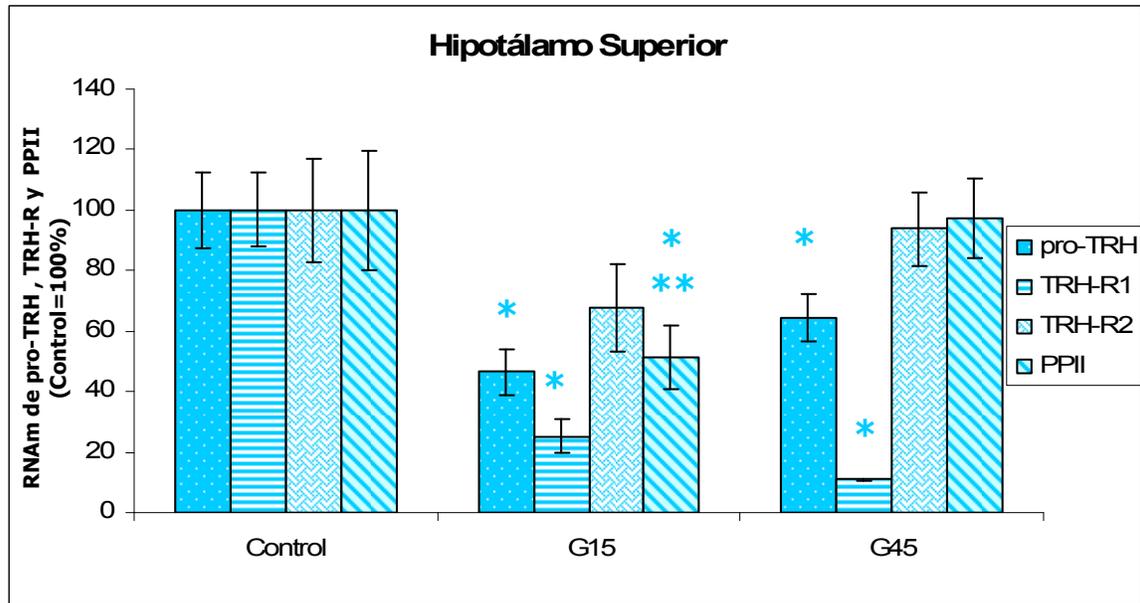
- RNAm de PPII, CRH, CRH-R1, GR

La enzima inactivante del TRH, la PPII, mostró una disminución transitoria del 50% en el grupo G15, con respecto a los animales control. Los niveles del RNAm regresan a los basales en el grupo G45 (Gráfica4).

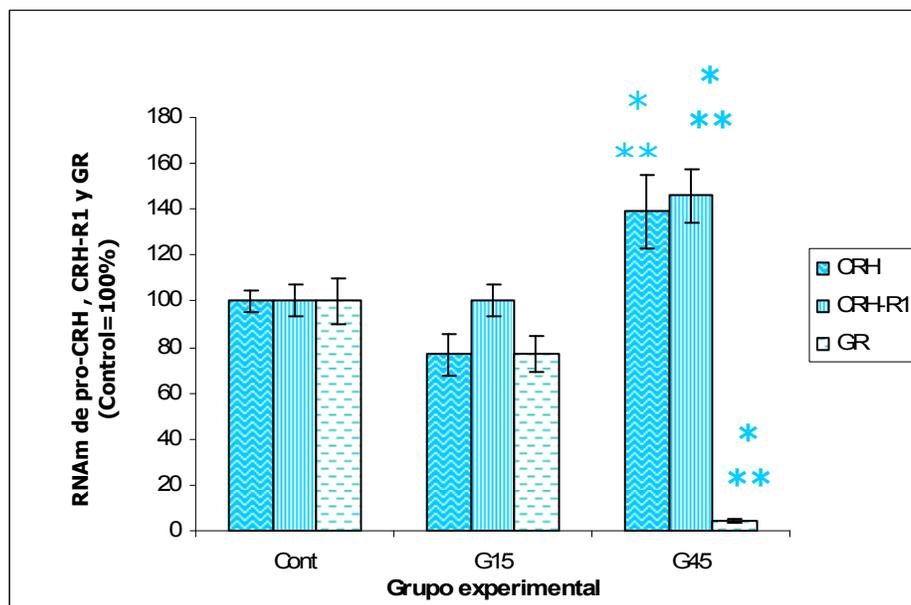
En la gráfica 5 se muestra que el RNAm de CRH se incrementó sólo en el grupo inmobilizado y sacrificado 45 minutos post-IMO (grupo control: $100 \pm 4.5\%$; G15 76.7 ± 8.8 y G45 138.9 ± 15.6). Este comportamiento también se observó en el RNAm de su receptor, el CRH-R1 (control $100.6 \pm 7.1\%$; G15 $100 \pm 6.9\%$ y G45 $146.2 \pm 11.7\%$). Cuantificamos además la concentración del RNAm del receptor a glucocorticoides (GR) y observamos una disminución del 90% ($p < 0.05$) en el grupo G45 (Gráfica 5).



Gráfica 3. Cambios en el contenido de TRH en el hipotálamo mediobasal en respuesta al estrés psicológico agudo. El hipotálamo medio basal fue disecado de los animales descritos en la Graf 1. El contenido del TRH fue medido por RIA y los resultados se expresan en porcentajes del control (control= 11192 ± 1146.1 pg TRH /mg prot, $n = 18$). Cambios significativos con * $p < 0.05$ VS control.



Gráfica 4. Cambios en los niveles de RNAm de pro-TRH, TRH-R y PPII en el Hipotálamo Dorsal en respuesta al estrés psicológico agudo. Los niveles de RNAm fueron medidos por RT-PCR y los productos se corrieron en geles de agarosa en cámaras de electroforesis. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se digitalizaron para obtener unidades arbitrarias que fueron corregidas con los valores de ciclofilina. Los resultados se expresan como porcentaje del control. * VS control y ** VS G45, $p < 0.05$. $n = 12$.



Gráfica 5. Cambios en los niveles de RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en el hipotálamo superior en respuesta al estrés psicológico agudo. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control.* VS Control y ** VS G45, $p < 0.05$. $n = 12$.

Amígdala

- Contenido tisular de TRH y de su RNAm

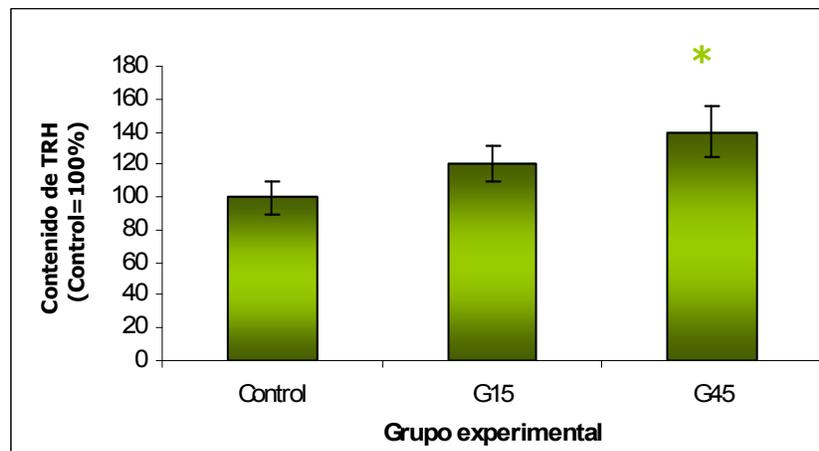
En esta región se detectó un aumento en el contenido del péptido (gráfica 6) en el grupo de animales sacrificados 45 minutos posteriores a la prueba de estrés (control: $100 \pm 10.22\%$; G15: $120 \pm 11.2\%$ y G45: $140 \pm 15.3\%$). En contraste, no hubo cambios de los niveles del RNA mensajero de pro-TRH en ninguno de los grupos experimentales (control: $100 \pm 15\%$; G15: $147.7 \pm 29.8\%$ y G45: $119.6 \pm 34\%$) (Gráfica 7).

La expresión de los receptores de TRH mostró cambios diferenciales; los niveles del RNAm de TRH-R1, no mostraron cambios mientras que los de TRH-R2 aumentaron en el grupo G15 (Control: $100 \pm 18.9\%$; G15: $267.3 \pm 26.9\%$ y G45: $134.9 \pm 12\%$) (Gráfica 7).

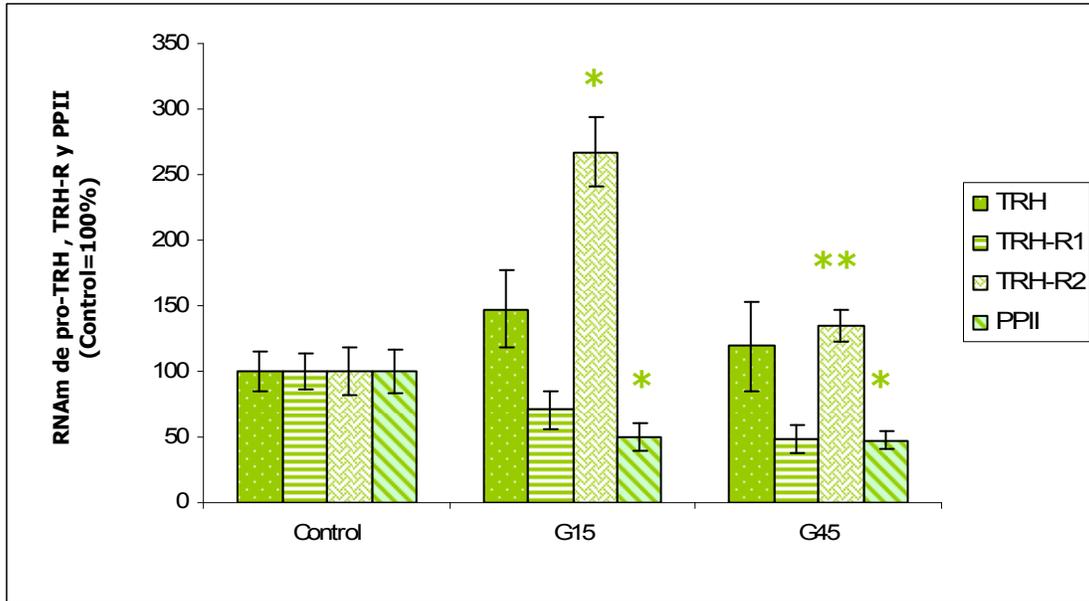
- RNAm de PPII, CRH, CRH-R1 y GR

Al igual que en el Hipotálamo Dorsal, los niveles del RNAm de la enzima inactivante resultaron estar disminuídos en un 50% en ambos grupos experimentales (Gráfica 4).

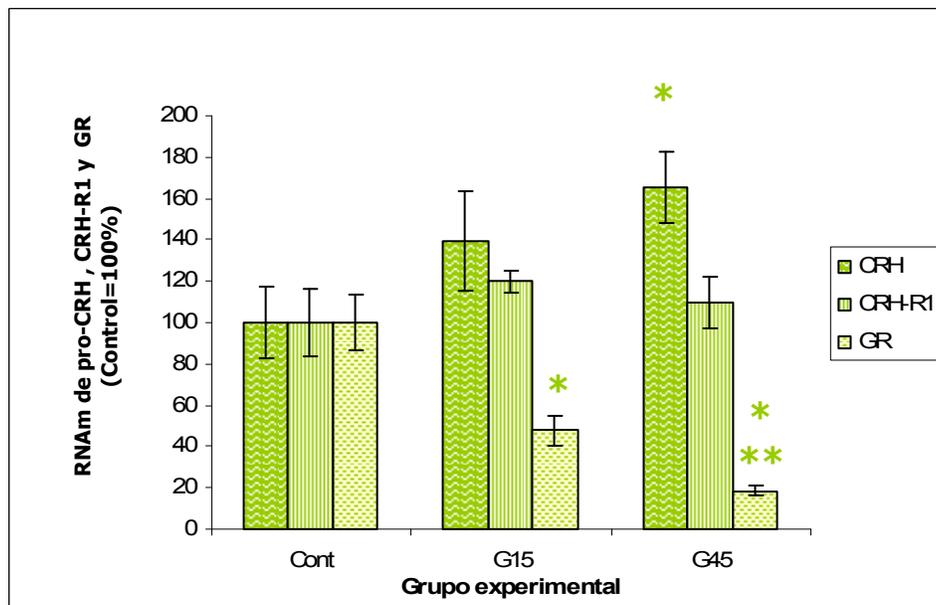
Los niveles de RNAm de pro-CRH, aumentaron en el grupo G45 (control: $100 \pm 17\%$; G15 $139.2 \pm 24.1\%$ y G45 $165.1 \pm 17.4\%$), mientras que los niveles del RNAm de su receptor CRH-R1, se mantuvo sin cambios, de acuerdo a los resultados publicados previamente por el grupo de Makino S, et al. [Makino S, 1995] (Gráfica 8). Los niveles de RNAm de GR disminuyeron en ambos grupos experimentales (G15: 52.4 y G45: 81.3 ; $p < 0.05$).



Gráfica 6. Cambios en el contenido de TRH en la amígdala. La región amigdalina fue disecada de los animales descritos en la Graf. 1. El contenido del TRH fue medido por RIA y los resultados se expresan en porcentajes del control (control= 2459 ± 322.5 pg TRH /mg prot, n=18). * $p < 0.05$ vs control.



Gráfica 7. Cambios en los niveles de RNAm de pro-TRH y TRH-R en la amígdala. Los niveles de RNAm fueron como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. ANOVA de una vía y análisis post-hoc con la prueba de Fisher, cambios significativos con $p < 0.05$ (indicado con * vs control y ** vs G15), $n=12$.



Gráfica 8. Cambios en los niveles de RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la amígdala. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. * $p < 0.05$ VS Control y ** VS G15. $n=12$.

Corteza frontal

- Contenido tisular de TRH y de su RNAm

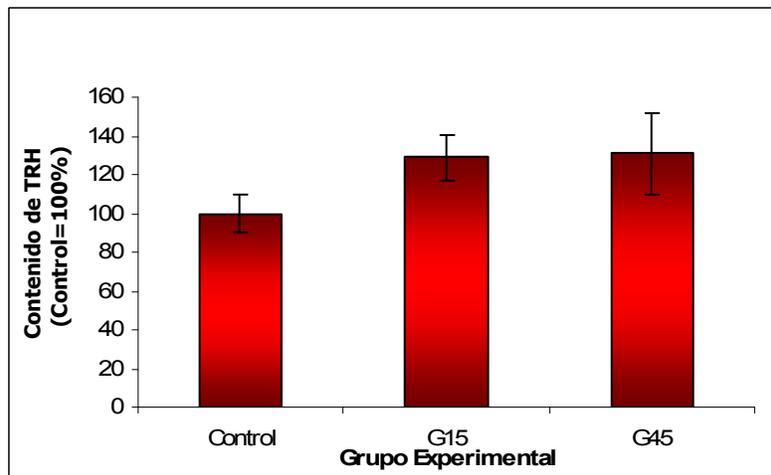
En esta región no se registraron cambios significativos en el contenido del péptido en ninguno de los grupos experimentales (control: $100 \pm 9.3\%$; G15: $128.8 \pm 11.6\%$ y G45: $130.8 \pm 21.1\%$; gráfica 9).

Aunque en condiciones normales el RNAm de pro-TRH se expresa escasamente en la corteza frontal, se pudo detectar que los niveles disminuyeron en los ambos grupos experimentales (control: $100 \pm 20.1\%$; G15: $36.1 \pm 9.3\%$ y G45: $33.3 \pm 8.3\%$) (Gráfica 10).

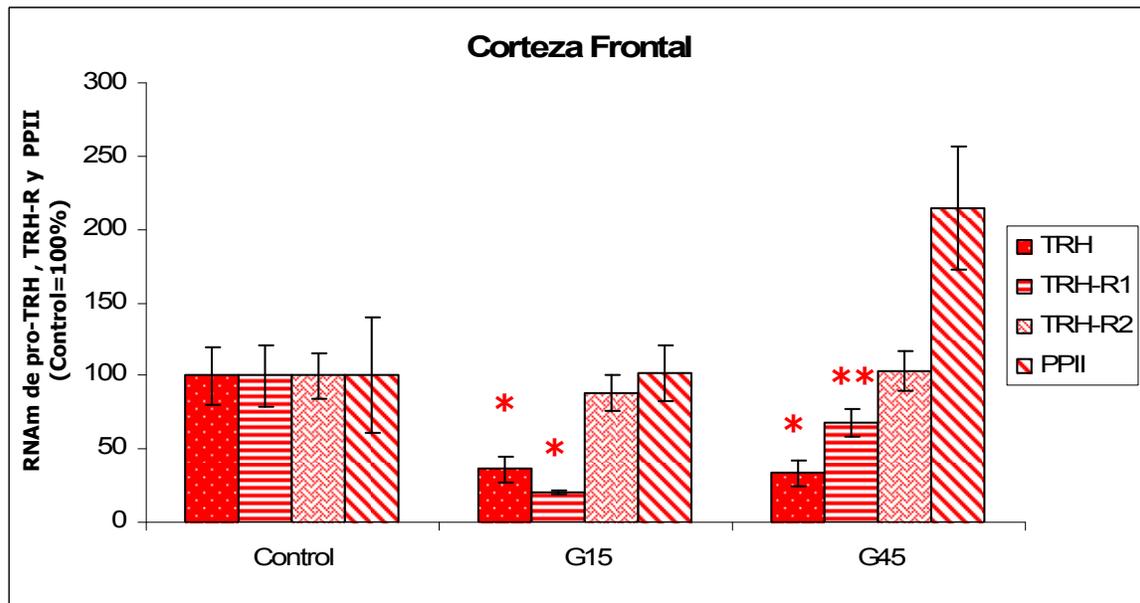
A diferencia de lo observado en la amígdala, los niveles de RNAm de TRH-R1 disminuyeron en la corteza del grupo G15 (Control: $100 \pm 21.1\%$; G15: $19.9 \pm 1.5\%$ y G45: $68 \pm 10\%$), mientras que no cambiaron los niveles del RNAm de TRH-R2 (Control: $100 \pm 15.3\%$; G15: $87.9 \pm 12.2\%$ y G45: 103.8 ± 13.6) (Gráfica 10).

- RNAm de PPII, pro-CRH y GR

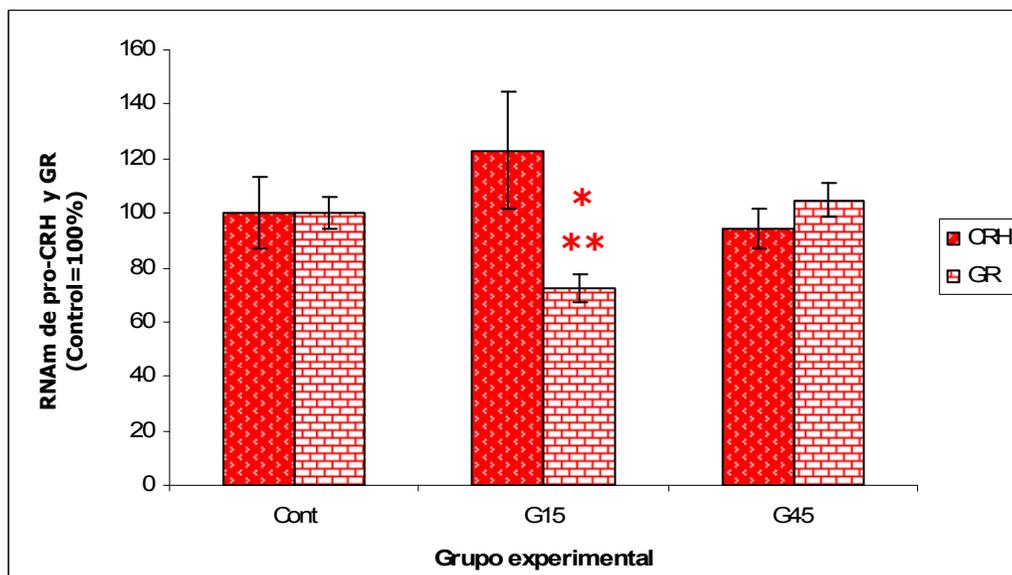
Los niveles de la enzima inactivante del TRH no mostraron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales (Control: $100 \pm 39.9\%$; G15: $101.7 \pm 19.2\%$ y G45: $214.5 \pm 41.7\%$, Gráfica 10), al igual que los de pro-CRH (Control: $100 \pm 12.9\%$; G15: $123 \pm 21.3\%$ y G45: $94.1 \pm 7.4\%$); en contraste, los niveles de RNAm de GR disminuyeron en el grupo G15 27.7% ($p < 0.05$) (Gráfica 11).



Gráfica 9. Cambios en los niveles del contenido de TRH en la corteza frontal. El contenido del TRH fue medido por RIA en corteza frontal disecada de los animales descritos en la Fig. 1. Los resultados se expresan en porcentajes del control (control= 740.2 ± 90.7 pg TRH /mg prot, n=18). * $p < 0.05$ vs control. n=18



Gráfica 10. Cambios en los niveles de RNAm de pro-TRH y TRH-R en la corteza frontal. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf. 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. * $p < 0.05$ vs control y ** vs G15, $n = 12$.



Gráfica 11. Cambios en los niveles de RNAm de pro-CRH y GR en la corteza frontal. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf. 4 y los resultados se expresan como porcentaje del control. * $p < 0.05$ vs control y ** vs G45, $n = 12$.

Núcleo Accumbens

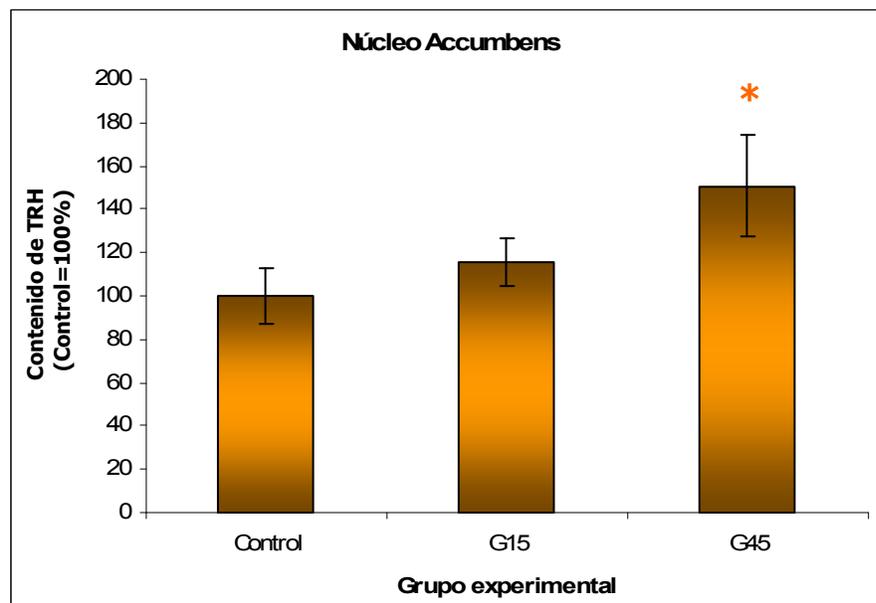
- Contenido tisular de TRH y de su RNAm

En el núcleo accumbens aumentó el contenido del péptido en el grupo G45 (controles: $100 \pm 13\%$; G15: $115.5 \pm 10.8\%$ y G45: $150.9 \pm 23.4\%$. Ver gráfica 12), así como los niveles del RNAm de pro-TRH (Control: 100 ± 8.3 ; G15: 75.1 ± 13.5 y G45: 141 ± 8.9 ; ver gráfica 13) en los experimentos II y III.

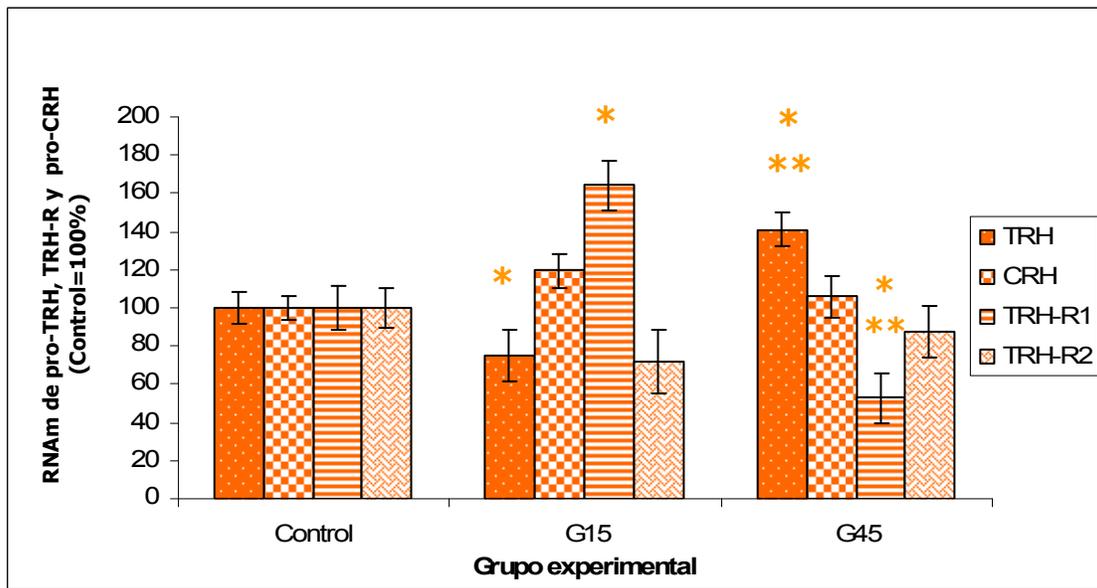
Los niveles de RNAm de TRH-R1 en el grupo G15 incrementaron, seguido de una disminución en el grupo G45 (Control: $100 \pm 11.4\%$; G15: $164.4 \pm 12.9\%$ y G45: 53.1 ± 13). No se observaron cambios en los niveles de RNAm de TRH-R2 (control: $100 \pm 10.4\%$; G15: $72.1 \pm 16.6\%$ y G45: $87.2 \pm 13.5\%$)(Gráfica 13).

- RNAm de CRH

Los niveles de RNAm de pro-CRH no mostraron ningún cambio estadísticamente significativo (control: $100 \pm 6.5\%$; G15: $119.4 \pm 8.7\%$ y G45: 106 ± 10.9) (Gráfica 13).



Gráfica 12. Cambios en el contenido de TRH en el núcleo accumbens en respuesta al estrés psicológico agudo. El contenido del TRH fue medido por RIA en el núcleo accumbens disecado de los animales descritos en la Fig. 1. El contenido del TRH fue medido por RIA y los resultados se expresan en porcentajes del control (control izquierdo = 3540.2 ± 517.3 pg TRH /mg prot, n=12). Cambios significativos con $p < 0.05$ (indicado con * vs control).



Gráfica 13. Niveles de RNAm de pro-TRH, TRH-R y CRH en el núcleo accumbens. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. * $p < 0.05$ vs control y ** VS G15), $n = 12$.

Septum

- Contenido tisular de TRH, de su RNAm y RNAm de CRH

En esta región no observamos cambios estadísticamente significativos en ninguno de los parámetros medidos en nuestro estudio. Los datos obtenidos se muestran resumidos en las tablas 1 y 2.

	Contenido de TRH izquierdo
Control	100±17.2
G15	65.3±9.4
G45	76.3±10.5

Tabla 1. Contenido de TRH en el septum. El contenido del TRH fue medido por RIA en el Septum disecado de los animales descritos en la Fig. 1. El contenido del TRH fue medido por RIA y los resultados se expresan en porcentajes del control (control izquierdo= 2410.5 ± 358.5 pg TRH /mg prot, n=12).

	TRH RNAm	TRH-R1 RNAm	TRH-R2 RNAm	CRH RNAm
Control	100±12.9	ND	100±9.3	100±19.6
G15	79.7±17.3	ND	128.8±11.6	107.8±19.6
G45	134.3±16.1	ND	130.8±21.1	100.12±18

Tabla 2. Niveles de RNAm de pro-TRH, TRH-R2 y pro-CRH en el septum. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. n=12. ND: significa datos no detectables.

Hipocampo anterior

- Contenido tisular de TRH y de su RNAm

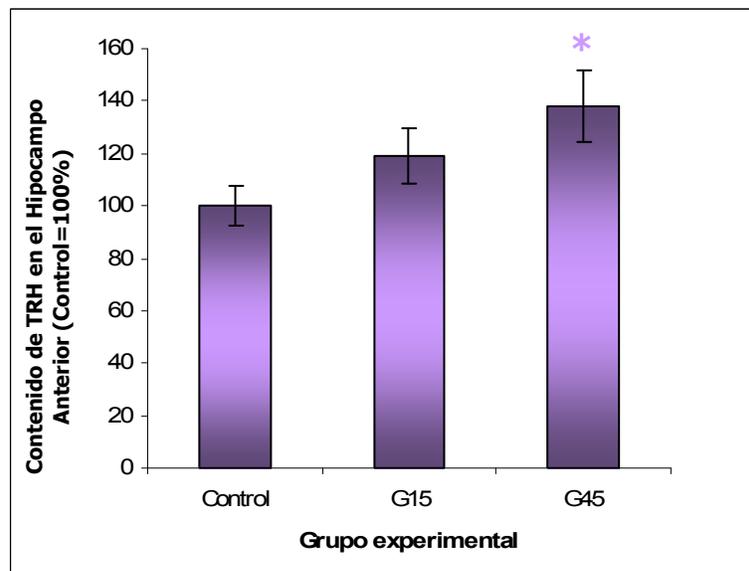
Pudimos detectar cambios en el contenido del péptido en el grupo G45, observándose un aumento en el hipocampo anterior izquierdo (experimentos II y III) (Control: $100 \pm 7.7\%$; G15: $118.9 \pm 10.6\%$ y G45: $137.9 \pm 13.8\%$).

Los niveles de RNAm de pro-TRH no mostraron cambios significativos con respecto al grupo control.

Aunque en este proyecto se intentaron cuantificar los niveles del mensajero de los receptores de TRH, en esta región no fue posible detectarlos con las técnicas utilizadas en este estudio. Lo anterior está de acuerdo a lo reportado por Heuer, que postula que sus niveles son demasiado bajos para ser detectados [Heuer H, 2000] si bien en el modelo del laberinto de agua, pudo detectarse el TRH-R1 (datos del laboratorio no publicados).

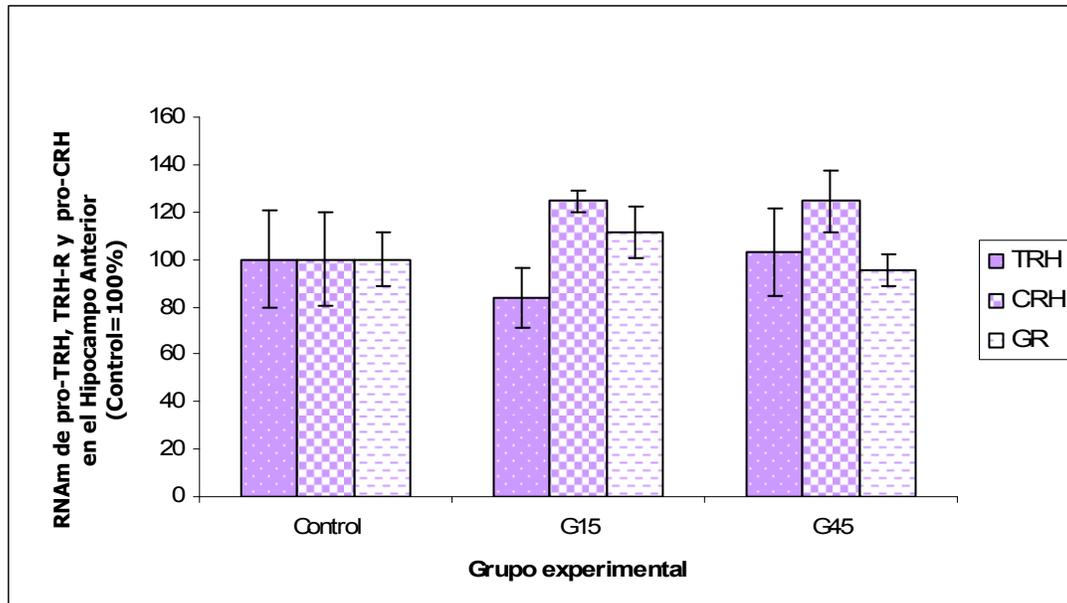
- RNAm de CRH y GR

Los niveles de RNAm de pro-CRH y GR no mostraron cambios en ninguno de los grupos experimentales (pro-CRH Control: $100 \pm 19.5\%$; G15: $124.5 \pm 4.6\%$; G45: $124.6 \pm 13.2\%$; GR Control: $100 \pm 19.5\%$; G15: $124.5 \pm 4.6\%$; G45: 124.6 ± 13.2) (Gráfica 17).



Gráfica 16. Cambios en el contenido de TRH en el hipocampo anterior en respuesta al estrés psicológico agudo.

El contenido del TRH fue medido por RIA en el Hipocampo Anterior disecado de los animales descritos en la Graf 1. Los resultados se expresan en porcentajes del control (control derecho= 2347.7 ± 247.9 pg TRH /mg prot, n=6; control izquierdo= 2410.5 ± 358.5 pg TRH /mg prot, n=12). * $p < 0.05$ vs control.



Gráfica 17. Niveles de RNAm de pro-TRH, pro-CRH y GR en el hipocampo anterior. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. * $p < 0.05$ vs control, $n = 11$.

Hipocampo Posterior

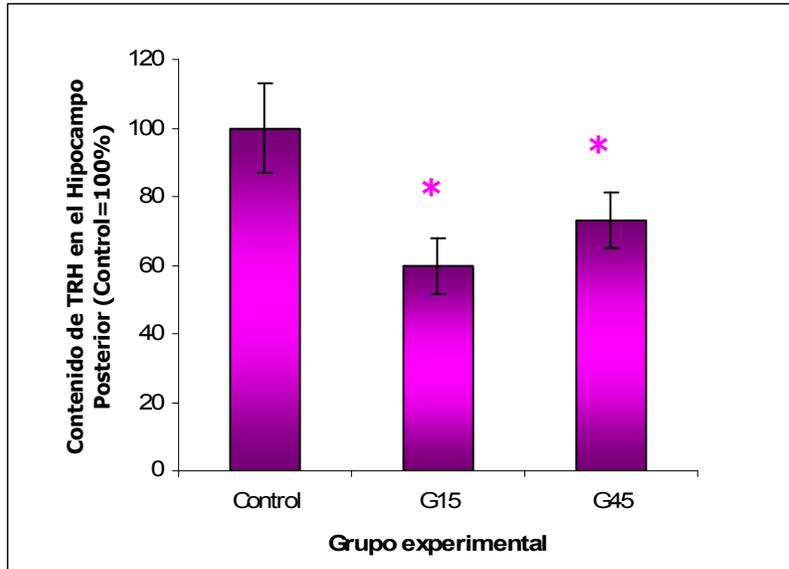
- Contenido tisular de TRH y su RNAm

El contenido del péptido disminuyó en ambos grupos experimentales (Control: 100 ± 13.1 ; G15: 59.6 ± 8 y G45: $73.1 \pm 8.3\%$) Se muestran los resultados del hemisferio izquierdo de los experimentos II y III (Gráfica 18).

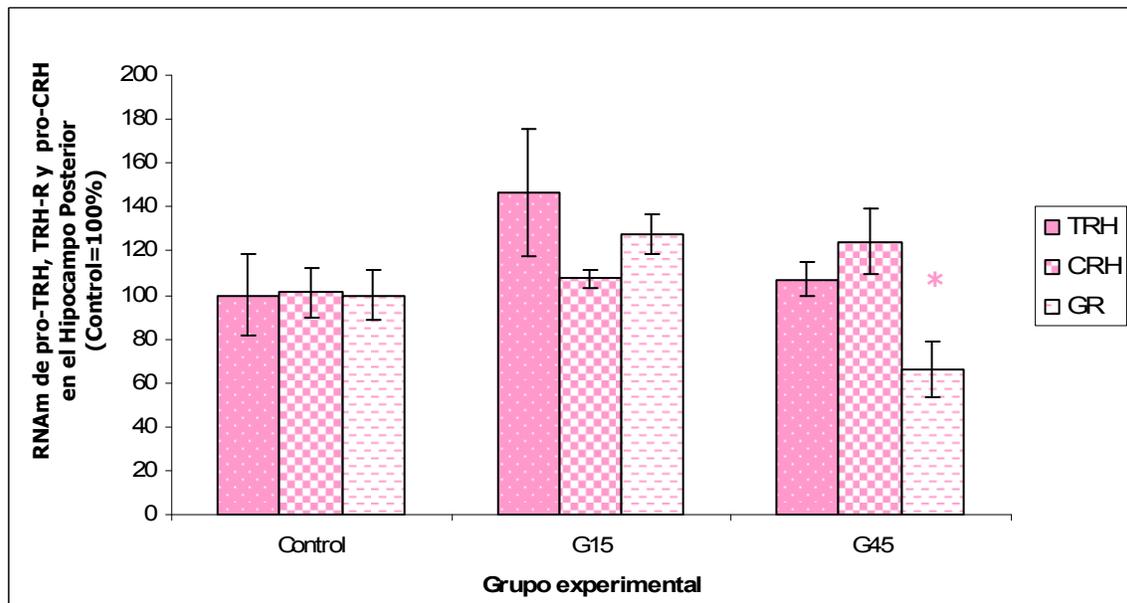
Los niveles de RNAm de pro-TRH no mostraron cambios estadísticamente significativos en ninguno de los grupos experimentales.

- RNAm de CRH y GR

Los niveles de RNAm de pro-CRH no mostraron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales. Sin embargo, en el grupo G45 fue posible observar una disminución del 34.1 ($p < 0.05$) en el RNAm de GR con respecto del control.



Gráfica 18. Cambios en el contenido de TRH en el hipocampo posterior. El Hipocampo Posterior fue diseccionado de los animales descritos en la Graf 1. El contenido del TRH fue medido por RIA y los resultados se expresan en porcentajes del control (control izquierdo= 3337.3 ± 719 pg TRH /mg prot, n=11). * $p < 0.05$ vs control.



Gráfica 19. Niveles de RNAm de pro-TRH, TRH-R y pro-CRH en el hipocampo posterior. Los niveles de RNAm fueron medidos como se describe en la Graf 4. Los resultados se expresan como porcentaje del control. * $p < 0.05$ vs G15, n=11.

En resumen, los resultados obtenidos que fueron significativos en las distintas regiones y parámetros cuantificados, se muestran representados en la siguiente tabla:

	G15	G45
Eje HHA :	 CORT	 RNAm pro-CRH y CRH-R1 (HD)
Eje HHT:	 TSH  Contenido TRH (EM)  RNAm TRH-R1 y PPII (HD)	 RNAm GR (HD)  Contenido TRH (EM)  RNAm TRH-R1 (HD)
Amígdala	 RNAm TRH-R2  RNAm GR y PPII	 Contenido TRH y RNAm pro-CRH  RNAm GR y PPII
Corteza frontal	 RNAm TRH-R1  RNAm GR	 RNAm pro-TRH y TRH-R1
Núcleo Accumbens	 RNAm pro-TRH  RNAm TRH-R1	 Contenido TRH RNAm pro-TRH  RNAm TRH-R1
Septum	Sin cambios	Sin cambios
Hipocampo Anterior	Sin cambios	 Contenido de TRH
Hipocampo Posterior	 Contenido TRH	 Contenido TRH y RNAm GR

Simbología:  aumentos significativos
 disminuciones significativas

Abreviaturas: EM= Eminencia Media
HD= Hipotálamo Dorsal

7. Discusión

7.1 La respuesta neuroendocrina al estrés psicológico agudo.

- Eje HHA.

En este estudio se evidenció la activación del eje HHA durante el paradigma de estrés agudo por IMO, demostrando que este modelo es adecuado para estresar a los animales y producir una respuesta adrenal. Lo anterior se basa en la variación observada en los siguientes parámetros:

1) El aumento en los niveles del RNAm de pro-CRH en el hipotálamo en el grupo G45. El sistema CRHérgico es el principal sistema peptidérgico implicado en regular las respuestas al estrés de tipo conductuales, autonómicas, neuroendócrinas e inmunes [Roseboom PH, et al., 2005]. Se observó la activación del sistema CRHérgico hipotalámico en nuestros animales inmovilizados y decapitados 45 min. post-IMO de acuerdo a lo reportado utilizando este modelo [Imaki T. et al., 2001]. El incremento observado en los niveles de RNAm de CRH-R1 fue similar al reportado en el PVN en respuesta a 2h de IMO [Makino S, et. al, 1995].

2) El aumento en la concentración de CORT sérica en el grupo G15 y su posterior disminución a los niveles basales en el grupo G45 donde es evidente que los animales se han recuperado del estrés. Lo anterior es consistente con reportes previos donde se observa que existe un aumento significativo en las hormonas de estrés (ACTH y CORT) desde los 15 minutos posteriores a la inducción de estrés por IMO [Paskitti ME, et al., 2000] y regresa a sus niveles basales aproximadamente 2 horas posteriores a la prueba de estrés [de Kloet, et al., 2005].

3) Además, se muestran evidencias de los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HHA que ocurren en consecuencia a la activación del eje HHA en este modelo, pues los niveles del RNAm de GR disminuyeron en el grupo experimental G45 en regiones como la corteza frontal, el hipotálamo, la amígdala y el hipocampo, las cuales se ha demostrado que están involucradas en este proceso. Esta disminución está de acuerdo con lo reportado por Paskitti et al., en donde se ha observado que los niveles del RNA heteronuclear de GR disminuyen con respecto a los niveles basales, aproximadamente 2 horas posteriores al inicio del estímulo estresante [Paskitti ME, et al., 2000].

- Eje HHT

De manera opuesta a lo que ocurre con el eje HHA, que se encuentra activado bajo la condición de estrés agudo por IMO, el eje HHT se encuentra inhibido de forma transitoria en este paradigma. Lo anterior es evidente en el grupo experimental G15, donde los niveles de TSH sérica disminuyeron en comparación con los controles; los niveles basales de la hormona tienden a recuperarse en el grupo G45. Esta disminución en los niveles de TSH puede ser explicada por la inhibición de las vías TRHérgicas del hipotálamo (superior y medio-basal), que se refleja en dos parámetros medidos:

1) El aumento en el contenido del péptido en el hipotálamo basal de ambos grupos experimentales, que puede interpretarse como una acumulación del péptido por falta de la liberación del mismo. Aunque no se sabe mucho acerca de los mecanismos moleculares que ocurren en la membrana pre-sináptica que pudieran ser los responsables de la inhibición de la liberación del péptido, es posible pensar que algunas de las proteínas clave involucradas en la exocitosis del TRH, como la SNAP-25 [Matsumoto N, et al., 1997], pudiera estar inactivada en este modelo ó ser la consecuencia de la activación de las aferencias inhibitorias del PVN, como son las GABAérgicas [Fekete C, et al., 2002].

2) La disminución del mensajero de pro-TRH en los grupos G15 y G45, que sugiere que la síntesis del péptido se encuentra disminuida por efecto del estrés. Este resultado es consistente con estudios previos donde se muestra que durante tiempos prolongados de IMO (2h), se inhibe el eje tiroideo y que la expresión del RNAm de TRH en el PVN disminuye de manera determinante en ratas machos F344 [Cizza et al., 1995 y 1996].

Los efectos fueron transitorios, la recuperación en los niveles de tirotrópina en el grupo G45 puede explicarse por la tendencia que se observa en el contenido del TRH a disminuir (lo que querría decir que éste está comenzándose a liberar nuevamente) y del mensajero de pro-TRH a aumentar su síntesis ligeramente con respecto al grupo G15, que, aunque no alcancen los valores adecuados para ser significativamente distintos del grupo G15, podría sugerir que el organismo se está recuperando del desequilibrio homeostático causado por el estrés.

Otra explicación pudiera ser que existen evidencias que demuestran que la corticosterona puede deprimir la actividad del eje HHT. En animales adrenalectomizados, la inyección de corticosterona inhibe la expresión de TRH en el PVN [Kakuscka I, et al. 1995]. Estos datos permitirían explicar la disminución de TSH en el grupo G15, que coincide con el pico máximo de CORT y, el efecto transitorio, puede deberse al corto tiempo de inmovilización (30 min).

Un hallazgo interesante fue la inhibición de la expresión del receptor TRH-R1 en hipotálamo superior. Los cambios observados en los niveles del RNAm de los receptores de TRH nos permiten

inferir que los niveles del mensajero de los receptores están relacionados con la liberación del TRH (ó disminución de la misma) en las distintas regiones estudiadas en nuestro estudio. El gen de TRH-R presenta entre sus sitios de regulación una secuencia muy parecida a los sitios de unión de los factores de transcripción AP-1 y GRE [Ver en Bauer K, et. al, 1999], los cuales pudieran ser los elementos de respuesta responsables de que la transcripción de los receptores esté siendo regulada en este paradigma, probablemente, al activarse la vía de señalización de las MAPK y las proteínas ERK 1 y 2. Cabe mencionar que los cambios en los niveles del RNAm de los receptores no necesariamente se verán reflejados en los niveles de la proteína receptora (que sería el producto funcional de la vía), si bien el TRH causa un aumento considerable en la proteína del receptor durante 48 horas en células hipofisarias en cultivo [Cook LB, et al., 2004]. A diferencia de lo que se conoce en cuanto a la regulación homóloga del RNAm de CRH-R1 en hipotálamo, no se tienen evidencias sobre la relevancia fisiológica de la modulación del TRH-R1 en esta zona. Resultados no publicados de L. James y P. de Gortari muestran también una inhibición provocada por la restricción alimentaria o, por 1h de estimulación al frío (donde se incrementan los niveles de RNAm de TRH y la liberación del péptido).

Condiciones de estrés agudo ó crónico pueden alterar la secreción de las hormonas que componen el eje HHT y que tanto el estrés fisiológico, como el psicológico, causa alteraciones en los niveles del RNAm de TRH en el PVN [Helmreich D et al., 2005]. Así, se demuestra en este trabajo que algunas condiciones que regulan la actividad del eje adrenal puede afectar también la actividad del eje tiroideo en tiempos cortos; en algunos casos como la estimulación por frío, hay una activación del HHT y del HHA, lo cual puede ser explicado por la convergencia anatómica que presentan varios de los circuitos neurales que modulan ambos ejes en las neuronas hipotalámicas parvocelulares del PVN como son las aferencias noradrenérgicas o serotoninérgicas [Ver en Swanson LW, et al. 1986]. Antes se mencionó la posible influencia de corticosterona sin embargo, es necesario profundizar más para poder definir si los efectos observados son debidos a influencias de tipo neuronal, hormonal o una combinación de ambos.

Una inhibición del eje tiroideo en respuesta al estrés psicológico podría repercutir en una disminución del metabolismo basal (efecto principal de las hormonas tiroideas), permitiendo al animal un ahorro energético.

7.2 Respuesta del sistema límbico por el estrés psicológico agudo

Además de la activación del eje HHA, pudimos observar durante los procedimientos experimentales, que algunos de los animales inmovilizados, al regresar a sus cajas mostraban conductas de enterramiento, que es un parámetro conductual de ansiedad en los roedores, así como un aumento en el acicalamiento y exploración en las cajas, que, aunque no fueron medidos como parámetros conductuales en este estudio, podrían indicarnos que el estrés producido afecta la conducta de los animales. Estudios previos también han observado que los animales que han sido expuestos a un solo periodo de IMO durante 15 min y, posteriormente sometidos a pruebas de ansiedad, como el Laberinto en Cruz Elevado (EPM, Elevated plus-maze), muestran mayores indicadores de ansiedad que los animales que no fueron inmovilizados previos a la prueba de ansiedad [Calvo N y Volosin M, 2000].

En el paradigma presentado en este proyecto se muestran evidencias de que no sólo el metabolismo del TRH es afectado por la condición de estrés agudo por IMO en el hipotálamo, sino también en distintas regiones del sistema límbico involucradas en la respuesta a estímulos estresantes de tipo psicológico.

Desde que se demostró que las lesiones amigdalinas en primates anulaban la respuesta al miedo (síndrome de Kluver y Bucy), la amígdala se ha reconocido como un elemento de crucial importancia para las bases neurales de las emociones. Una de las funciones de la amígdala en el sistema límbico es el procesamiento de las señales neurales producidas por los estresores de tipo psicológico y la manifestación de las emociones relacionadas al estrés, como lo son el miedo y la ansiedad [Ver en Gutiérrez Mariscal, 2002 y 2005]. Estudios previos han demostrado que las vías TRHérgicas amigdalinas son moduladas en distintos paradigmas experimentales, como el ayuno, la estimulación eléctrica subumbral de la amígdala (kindling) y la ingestión de glucosa [Blake NG, et al., 1991; de Gortari 2000 et al., 2000; de Gortari P, et al., 2005; de Gortari, et al., 2006]. En nuestro paradigma fue posible observar el incremento en los niveles de RNAm de CRH en esta región; la activación de la transmisión CRHérgica en la amígdala ha sido reportado previamente [Kali NH, et al., 1994], lo cual es un indicador del estrés psicológico que se está produciendo en los animales durante la inmovilización. Encontramos además cambios significativos a nivel del contenido de TRH en esta estructura, pero no en los niveles de RNAm de pro-TRH, en contraste con los hallazgos de Gutiérrez-Mariscal que detecta disminución de la expresión TRHérgica en el modelo de enterramiento defensivo [Gutiérrez-Mariscal M, 2005. Tesis de maestría, datos no publicados], al igual que en el modelo de estrés crónico por IMO, donde las vías TRHérgicas amigdalinas se encuentran inhibidas de manera específica al estresor [García- Vázquez, A. 2005, tesis de maestría; datos no publicados]. Lo anterior puede ser explicado debido a la severidad y tiempo de exposición al estímulo estresante. Sin embargo, la modulación que presenta la expresión de los receptores a TRH (incremento en RNAm de TRH-R2) apoya la posible participación de las vías TRHérgicas en la amígdala. El aumento en los

niveles del RNAm de TRH-R2 en la amígdala se ha observado también en el paradigma de enterramiento defensivo en nuestro laboratorio, mientras que, como consecuencia de la restricción alimentaria, los niveles de TRH-R1 están disminuidos [James y de Gortari].

La corteza frontal fue otra estructura límbica que mostró variaciones en el metabolismo del TRH por efecto del estrés agudo por IMO. Se ha postulado a la corteza frontal como una región límbica que actúa en concierto con otras estructuras cerebrales para regular la respuesta al estrés [Ver en Herman JP, et al., 2003]. Esta estructura responde a distintos paradigmas de estrés y está involucrada en modular la activación del eje HHA; manifiesta una intensa expresión de *c-fos* después de inducir estrés agudo por inmovilización (IMO) en animales experimentales [Mohammad G, 2000]. La respuesta al estímulo neural puede ser la explicación por la cual observamos una disminución en los niveles del mensajero de pro-TRH, que implicaría que las vías TRHérgicas se estarían inhibiendo. El RNAm de pro-TRH se expresa en muy bajas cantidades y es incrementado por estimulación eléctrica (kindling, etapa II) [de Gortari et al., 2006], nuestra metodología fue capaz de detectar los niveles del mensajero adecuadamente y así, observar una disminución en los niveles. Las vías TRHérgicas de esta región se inhiben por la intoxicación por alcohol [de Gortari, et al., 2000]. La falta de cambios en el contenido sugeriría que no hubo cambios en la liberación por lo que la disminución en la expresión del receptor R-1 pudiera ser debida a otros efectores (resultados similares se observaron en respuesta a la restricción alimentaria [James L y P. de Gortari]. Es poca la información que se tiene con respecto a la activación del metabolismo del TRH en esta zona en condiciones de estrés psicológico y, por lo tanto, se requiere más información para entender con mayor profundidad el papel del TRH en la respuesta a este modelo en esta región.

En el hipocampo se ha propuesto la participación del TRH en los modelos de memoria y aprendizaje y las neuronas TRHérgicas presentes en esta zona pueden ser activadas por estimulación eléctrica en la amígdala (kindling) o por intoxicación por alcohol [de Gortari et al., 1995 y 2000]. En nuestro modelo fue posible observar cambios únicamente a nivel del contenido de TRH en las porciones anterior y posterior, lo cual pudiera explicarse porque se ha involucrado al TRH hipocampal con los efectos que estimulan el estado de alerta [Arnold, et al., 1991 y Nishino, et al., 1997]. No hubo cambios en la expresión del RNAm del TRH ó sus receptores por lo que no podemos diferenciar las vías neurales que participan en la liberación del péptido en la región hipocampal pues podrían ser causados por circuitos neurales que están conectados con el hipocampo y que sí se activaron durante el paradigma de estrés psicológico agudo, como el amigdalino [Majak K y Pitkanen A, 2003]. A pesar de que se sabe que el hipocampo es una región susceptible al estrés y que influye en el estado de activación del eje HHA, parece que el TRH hipocampal no está involucrado en la respuesta al estrés, pues las demás variables medidas durante nuestro estudio no mostraron ninguna diferencia

significativa en los grupos experimentales con respecto a los animales control. Esto ha sido observado, en nuestro laboratorio, en el paradigma de ansiedad por enterramiento defensivo y de estrés crónico por IMO, a diferencia de el laberinto de agua de Morris donde hay un incremento en el RNAm de TRH y de ambos receptores [Gutiérrez Mariscal, 2002 y 2005; García Vázquez A, 2005; Aguilar-Valles, 2005].

De todas las estructuras límbicas estudiadas, el septum fue el único que no mostró cambios en ninguno de los parámetros medidos. Se sabe que esta región límbica muestra una intensa inducción neural producida por distintos estresores predecibles y que las lesiones en sus divisiones medial y lateral afectan la respuesta adrenal a la IMO [Ver en Herman JP, et. al., 2003]. En nuestro laboratorio se ha visto que en el paradigma de estrés crónico por IMO existe una disminución en el contenido de TRH específica al estresor en esta región en animales estresados durante 7 días [García- Vázquez, A. 2005, tesis de maestría; datos no publicados]. Es posible que las discrepancias en estos datos se deban por la intensidad del estresor aplicado (considerada por algunos autores como "medianamente severa") ó por la corta duración del mismo (ya que al ser un paradigma de estrés agudo, la duración del estímulo estresante es corta).

Existen evidencias que demuestran que la inyección de análogos de TRH, como el YM-14673, en el núcleo accumbens induce un aumento importante en la actividad locomotora espontánea, efecto que es mediado por el sistema dopaminérgico mesolímbico [Adachi K, et. al., 1997] y que este mecanismo ocurre en una modalidad dosis dependiente [Miwa Y, et. al, 1995]. En este estudio se muestran evidencias de que el metabolismo del TRH está afectado por el paradigma de estrés agudo por IMO en esta región, ya que pudimos observar un aumento en el contenido del péptido en el grupo G45 y disminución en los niveles del RNAm de pro-TRH en G15, pero incremento a las 45 min; también se detectó una modulación dual en la expresión de TRH-R1, (incremento a los 15 min e inhibición a los 45). Se ha sugerido que las vías TRHérgicas del NAcc están involucradas en la actividad locomotora de los organismos. Al tratarse nuestro estudio de un paradigma de inmovilización en los animales, podría apoyar el papel inhibitorio de las vías TRHérgicas, lo cual coincide con el efecto de la inmovilización a tiempos cortos, pero que parecería activarse posteriormente y pudiera relacionarse con el aumento en el estrés y el estado de ansiedad inducido en los animales en este paradigma [Pan JT, et al., 1995; Rybnicova EA, et al.2001]. Sin embargo, es necesario corroborar esta hipótesis con otros paradigmas experimentales donde se induzca la actividad locomotora de los animales, como por ejemplo el ejercicio [Ramírez-Martínez CE, tesis de licenciatura, datos preliminares]. ■

Cabe mencionar que hasta ahora, los experimentos realizados en este tipo de estudios no permiten distinguir si la liberación del TRH ocurre específicamente en las regiones estudiadas, ó si el TRH liberado proviene de otras proyecciones neuronales cercanas a las regiones estudiadas. Llevar a cabo estudios de virus retrógrados, permitiría conocer las vías neurales que participan en la liberación del TRH que se activan en los paradigmas de estrés psicológico.

Los cambios diferenciales en la expresión de los receptores apoyan la propuesta de distintas funciones [Ver en Lu X, et al. 2003]; el TRH-R1 en el hipotálamo, la corteza y el núcleo accumbens, apuntan hacia su participación en la transmisión de señales neuroendócrinas y somatomotoras, mientras que el aumento en los niveles de RNAm de TRH-R2 en la amígdala podrían sugerir la participación de este receptor en eventos de estrés psicológico y ansiedad.

La expresión de PPII sólo se evaluó en hipotálamo dorsal, amígdala y corteza frontal (por falta de RNA suficiente de las otras regiones). En estas estructuras los niveles de RNAm de PPII tuvieron un comportamiento diferente, mientras que en hipotálamo posterior y en amígdala se encontraron inhibidos, en forma similar a la expresión de TRH-R1, no hubo efecto en la corteza frontal. Estos resultados difieren de la respuesta de la PPII en corteza a estímulos como kindling o intoxicación por alcohol que producen cambios rápidos [de Gortari et al., 1995, 2000, 2005]. La magnitud de la respuesta en amígdala e hipotálamo de ratas inmovilizadas fue similar para la PPII y el TRH-R1 a diferencia de lo encontrado en la amígdala de animales estimulados por kindling donde los cambios en PPII coincidían con los de TRH-R2 en la etapa II y con ambos receptores en la etapa V [de Gortari et al., 2006]. Es aventurado por el momento establecer alguna hipótesis sobre estas diferencias; sin embargo, estos resultados contribuyen a lo encontrado por el grupo de que la síntesis y actividad de la enzima inactivante del TRH, la PPII, está regulada por distintas condiciones experimentales, en una modalidad región-dependiente, en regiones donde se detectaron cambios específicos en el contenido ó síntesis del TRH y apoya la idea de que esta enzima juega un papel importante en la regulación de la función del TRH y, por lo tanto en la relevancia este neuropéptido en la conducta de los organismos [Charli et al., 1998; de Gortari et al., 1995, 2000, 2005. 2006].

En conclusión, nuestros datos apoyan que la modulación en los niveles de RNAm de los receptores de TRH y de la enzima inactivante son elementos más que indica la activación de las vías TRHérgicas en las regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas estudiadas en el paradigma expuesto en este trabajo si bien, no podemos inferir si se trata de regulación homóloga o heteróloga.

Podemos además proponer que en este modelo el sistema TRHérgico se regula a distintos niveles (contenido de TRH, síntesis del neuropéptido y de sus receptores) y ocurre en una modalidad región dependiente. El conjunto de estos resultados apoyan al TRH como una molécula neuromoduladora que actúa en el sistema límbico y que funciona en concierto con muchas otras moléculas para generar una respuesta ante los eventos de estrés psicológico agudo.

8. Conclusiones

- La inmovilización es un estresor psicológico efectivo, capaz de producir una respuesta adrenal en los animales y de activar regiones del sistema límbico que permiten darle un significado psicológico al estímulo estresante.
- El eje HHT se encuentra inhibido de manera transitoria durante esta condición, proceso que puede tener ventajas adaptativas, como el ahorro energético de los organismos en condiciones de estrés.
- El estrés psicológico agudo por IMO produce una inhibición en el metabolismo del neuropéptido TRH y/o sus receptores en distintas regiones del sistema límbico, como son: el hipotálamo, el núcleo amigdalino, la corteza frontal y el hipocampo.
- Se propone que la modulación de los receptores de TRH puede influir en las respuestas posteriores al péptido disponible en el espacio sináptico. Se propone que los receptores de TRH participan en la transmisión TRHérgica dependiendo del estímulo neural censado por las neuronas y su función parece depender de la región límbica que se activa con el estímulo aplicado.
- En conjunto, estos datos permiten concluir que la modulación de la biosíntesis del TRH ó los cambios en su contenido ocurren en distintas regiones, dependiendo del estímulo y apoyan el papel de este neuropéptido como neuromodulador en el sistema límbico.

9. Perspectivas

- Corroborar la participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina en otros paradigmas de ansiedad, como el Elevated Plus Maze (Laberinto en Cruz Elevado), de modo que se amplíe la información que se tiene en torno al metabolismo de TRH en paradigmas de estrés psicológico.
- La interferencia por RNAi en la expresión de algunos de los elementos que componen la transmisión TRHérgica (como el RNAm de pro-TRH, TRH-R ó PPII) en animales experimentales previas al paradigma de IMO, permitiría ampliar la información acerca de la participación de estos elementos en las estructuras límbicas que se activan en los paradigmas de estrés psicológico.
- La inyección intracerebroventricular de análogos de TRH (y cuando se encuentren disponibles, de antagonistas) nos podría permitir ampliar la información que se tiene en torno al papel que juega este neurotransmisor en los eventos de estrés psicológico.

10. Anexo

Buffer de RIA de TRH: 50 fosfatos mM pH 7.5, NaCl 125 mM, BSA grado RIA 0.25%.

Buffer de RIA de TSH: 50 mM de fosfatos pH 7.5, 150 mM de NaCl, 1% de BSA y 50 mM de EDTA.

Buffer de RIA de CORT: 10 mM de fosfatos pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.1% de gelatina de piel de becerro.

Solución E; Para preparar 100 ml: 98 ml de Na₂CO₃ al 2%, 1 ml de CuSO₄ al 1% y 1 ml de KNaC₄H₄O₆ al 2%.

Agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (DEPC); se añade 1 µl de DEPC [Sigma] por cada ml de agua, de modo tal que se obtiene una relación de 0.1% v/v para la extracción de RNA total.

Solución D [Chomczynski P, 1987]; la solución stock se preparaba de la siguiente manera: 250 g de Tiocinato de Guanidina disuelto en 293 ml de agua, 17.6 ml de Citrato de Sodio 0.75 M a pH 7, 26.4 ml de Sacarosil al 10% a 65° C. Esta solución se preparaba el día del procedimiento tomando 350 µl de β-mercaptoetanol (almacenado a 4° C), por cada 50 ml de solución stock. Así, se obtenía una solución de trabajo: 4 M de Tiocinato de Guanidina, 25 mM de Citrato de Sodio a pH 7, 0.5% Sarcosil y 0.1 M β-mercaptoetanol.

Mezcla de reacción para la Retro-Transcripción; esta mezcla correspondió a un volumen de 20 µl por tubo, compuesto de los siguientes reactivos: 8.9 µl de agua tratada con DEPC, 6 µl de amortiguador de reacción M-MLV RT 5X [Invitrogen] (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl y 15mM MgCl₂), 3 µl de dithiothreitol (DTT) (0.1 M) [Invitrogen], 0.6 µl de mezcla de deosinucleótidos -dNTP's- 10 mM (10 mM de cada uno de los siguientes reactivos: dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro [Invitrogen]), 1 µl de Oligo dT 0.5 g/ml y 0.5 µl de Transcriptasa reversa M.MVL RT 200 U/ml [Invitrogen].

Mezcla de reacción para PCR (Reacción de la Polimerasa en cadena); La reacción se realizó en un volumen final de 50 µl, que estaba compuesto por 4 ó 6 µl del cDNA (según el caso del oligo que se amplificaba), más 46 ó 44 µl de la siguiente mezcla de reacción: 35 ó 37 µl de agua tratada con DEPC, 5 µl Buffer de Taq DNA polimerasa 10X [Biotecnologías Universitarias] (KCl 500 mM, Tris-HCl, pH 8.3 100mM), 2.5 µl de MgCl₂ (30mM) [Biotecnologías Universitarias], 1 µl de dNTP's 10 mM (10 mM de cada uno de los siguientes reactivos: dATP, dGTP, dCTP y dTTP a pH neutro [Invitrogen]), 1 µl oligonucleótido sentido (ver más adelante), 1 µl de oligonucleótido anti-sentido (ver más adelante) y 0.5 µl de TAq DNA polimerasa 5 U/ml [Biotecnologías Universitarias].

Secuencias de los Oligonucleótidos; las secuencias que comprenden los oligonucleótidos [IBT, UNAM] que se utilizaron en este trabajo están contenidas en la siguiente tabla:

Abreviaciones: TF= tamaño del fragmento, NC= nucleótidos.

	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti-sentido
TRH [25 pmol/ μ l]	5' CCC-TGG-ATG-GAG-TCT-GAT-GT TF= 356 pb, NC= 587-943	5' GAC-AGC-TAG-TGA-AGG-GAA-CAG-G
CRH [25 pmol/ μ l]	5' TTT-CCG-CGT-GTT-GCT-GC TF= 326 pb, NC: 283-609	5' TTC-CTG-TTG-CTG-TGA-GC
TRH-R1 [25 pmol/ μ l]	5' ACC-CAG-AGA-AGC-AGG-CAG-CGT-GAC-A. TF= 248 pb, NC: 180-428	5' GAT-CCG-CCA-CAG-CCA-GAC-TCA-CCA-G
TRH-R2 [25 pmol/ μ l]	5' GTC-TTC-CTA-GTG-CTC-CTG-CTG-TG TF= 522 pb, NC: 437-937	5' CCA-GCA-AGG-GTC-CGA-TGA-AAA-AG
Ciclofilina [50 pmol/ μ l]	5' GGG-GAG-AAA-GGA-TTT-GGC-TA TF= 256, NC: 166-422	5' GGC-TGG-ATG-GCA-AGC-ATG-T
GR [25 pmol/ μ l]	5' AAA-AAG-CAC-ATC-ACA-CAT-AAA-TCT-G TF= 663, NC: 4903-5566	5' TAA-ATA-AGA-GGG-AGC-AAA-CTA-CTG-G
CRH-R1 [25 pmol/ μ l]	5' TCC-ACT-ACA-TCT-GAG-ACC-ATT-CAG-TAC-A TF= 247 pb, NC: 1623-1870	5' TCC-TGC-CAC-CGG-CGC-CAC-CTC-TTC-CGG-A
PPII [25 pmol/ μ l]	5' CTG-GAT-CGC-ATA-CAA-AAA-G	5' GGA-CAC-CCA-AAT-AAT-TGT-T

Buffer TBE: Para preparar una solución stock 5 X se mezclan 54 g de Tris Base, 27.5 g de Ácido bórico y 20 ml de EDTA (pH 8.0) 0.5M. Para preparar 100 ml de EDTA se pesan 18.61 g de EDTA y se añaden las lentejas poco a poco hasta que quedan disueltas.

11. Glosario

ACTH: Hormona Adrenocorticotrópica

AMPC: Adenosinmonofosfato cíclico

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

BLA: Núcleo Amigdalino Basolateral

CeA: Núcleo Central Amigdalino

CORT: Corticosterona,

CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina

CRH-R: Receptores del CRH

DNA: ácido desoxirribonucleico

EM: Eminencia Media

GC: Glucocorticoides

GR: Receptores a Glucocorticoides

HHA: eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal

HHT: eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides

IMO: Modelo de inmovilización

MeA: Núcleo Medial Amigdalino

MR: Receptor a Mineralocorticoides

NAcc: Núcleo Accumbens

Neurona CRHérgica: aquélla que expresa CRH como neurotransmisor peptidérgico

Neurona TRHérgica: aquélla que expresa TRH como neurotransmisor peptidérgico

PVN: Núcleo Paraventricular del Hipotálamo

RIA: radioinmunoensayo

RNA: ácido ribonucleico

RT-PCR: Transcripción Reversa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

SNC: Sistema Nervioso Central

TRH: Hormona liberadora de Tirotropina

TRH-R: Receptores del TRH

TSH: Tirotropina

PPII: Piroglutamil aminopeptidasa, enzima inactivante del TRH.

12. Referencias

- Adachi K, Hirose N, Fujioka H, Yonoshige N, Koshikawa N. 1997. Effects of YM-14673, a thyrotropin-releasing hormone analogue, injected into the shell of the nucleus accumbens on production of repetitive jaw movements in rats; comparison with the effects of a Dopamine D1 y D2 receptor agonist combination. *J Nihon Univ Sch Dent.* 39 (3): 142-6.
- Aguilar Valles A. Activación de las neuronas TRHérgicas de hipocampo de ratas entrenadas en el laberinto de morris. Tesis de Maestría en C. Bioquímicas, IBT, UNAM. 2005.
- Aguilar Valles, Sánchez-Jaramillo E, de Gortari P, Balderas I, Ramírez-Amaya V, Bermúdez-Rattoni F, Joseph-Bravo P. 2006. Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze; differential expression of CRH, CRH-R1, GR and BDNF in limbic regions.
- Bauer K, Schomburg L, Heuer H, Schäfer M, 1999. Thyrotropin Releasing Hormone (TRH), the TRH-receptor and the TRH-degrading ectoenzyme; three elements of a peptidergic signaling system. *Result Probl Cell Differ* (26): 13-42. Review.
- Bear MF, Connors BW, Paradiso MA. 2001. *Neuroscience*. Lippincot Williams and Wilkins. p.p. 581-591.
- Blake NG, Eckland JA, Foster OJF, Lightman SL. 1991. Inhibition of Hypothalamic Thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 129: 2714-2718
- Bolton AE. 1977. *Radiodination Techniques Review* 18. Amercham International Limited. Whitelion Road Amersham, England. HP79LL. December 1977.
- Briski K, Gilien E. 2001. Differential distribution of Fos expression within the rat preoptic area and hypothalamus in response to physical vs. psychological stress. *Brain Research bulletin* 55(3): 401-408.
- Calvo N, Volosin M. 2000. Glucocorticoid and Mineralocorticoid receptors are involved in the facilitation of anxiety-like response induced by restraint. *Neuroendocrinology* 73: 261-271.
- Carr FE, Reid A, Wessendorf MW. 1993. A cryptic peptide from the preprothyrotropin-releasing hormone precursor stimulates thyrotropin gene expression *Encocrinology*. 133(2): 809-14.
- Charli JL, Vargas MA, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P, Bourdais J, Pérez L, Uribe RM, Joseph-Bravo P. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of Pyroglutamyl peptidasa II. *Neurobiology* 6, 45-57, 1998.
- Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single Step of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
- Cizza G, Brady LS, Escaples M, Blackman MR, Gold PW, Chrousos GP. 1996. Age and Gender Influence Basal and stress- Modulated Hypothalamic-Pituitary-Thiroidal function un Fischer 344/N rats. *Neuroendocrinology* 64: 440-448

- Cizza G, Brady LS, Pácak K, Blackman MR, Gold PW, Chrousos GP. 1995. Stress-induced inhibition of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis is attenuated in the aged F344 male rats. *Neuroendocrinology* 62: 506-513
- Cook LB, Hinkle PM. 2004. Agonist-dependent up-regulation of Thyrotropin-Releasing Hormone receptor protein. *Biochem J.* 15 (380):815-821.
- Coppola A, Hughes J, Esposito E, Schiaco L, Meli R, Diano S. 2005. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett.* Aug 29; 579(21): 4654-8
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson SJ. 1995. Pattern time and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 64:477-505.
- Dallman MF, 2005. Fast glucocorticoid actions on brain: Back to the future. *Frontiers in Neuroendocrinology* 26:103-108.
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A. 2002. Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behavioral Brain Research* 129: 187-195.
- de Gortari P, Fernandez-Guardiola A, Martinez A, Cisneros M, Joseph-Bravo P. 1995. Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Res.* May 8; 679(1):144-50
- de Gortari P, Méndez M, Rodríguez-Keller I, Pérez-Martínez L, Joseph-Bravo P. 2000. Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem Int.* Nov-Dec; 37(5-6):483-96.
- de Kloet ER, Jöels M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 6: 463-475.
- Erickson K, Drevets W, Schulkin. 2003. Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 27: 233-246
- Fekete C, Wittmann G, Liposits Z, Lechan RM. 2002. GABA-ergic innervation of Thyrotropin-Releasing Hormone synthesizing neurons in the hypothalamus paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res.* 13; 957 (2): 251-8
- Ferguson SG, Caron MC. 1998. G Protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Cell and developmental Biology.* 9: 119-127.
- Fuchs E, Flügge G. 2003. Chronic social stress: effects on limbic brain structures. *Physiology and Behavior* 79: 417-427.
- Gary KA, Sevarino KA, Yarbrough G, Prange AJ, Winokur A. 2003. The Thyrotropin releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *J. Pharm Exp Ther.* 305, 410-416.
- Gavlin GB, Pare WP, Sandbak T, Bakke HK, Mmmurison R. 1994. Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev* 18: 223-229.

- Ginsberg AB, Campeau S, Day HE, Spencer RL. 2003. Acute glucocorticoid pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormone secretion and expression of corticotrophin-releasing hormone hnRNA but does not affect c-fos mRNA or Fos protein expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 1075-1083
- Golub MS, Campbell MA, Kaufman FL, Iyer P, Li Ling-Ho, Donald JM, Morgan JE. 2004. Effects of restraint stress in gestation: implications for rodents developmental toxicology studies. *Birth Defects Research (Part B)* 71: 26-36.
- Grino M, Guillaume V, Boudouresque F, Conte-Devolx B, Marltesse JY, Oliver C. 1990. Glucocorticoids regulate peptidyl-glycine alpha-amidating monooxygenase gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Mol Endocrinol* 4: 1613-1619.
- Gutiérrez Mariscal M, 2002. Participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH) en la ansiedad. Estudio preliminar a partir del modelo de enterramiento defensivo. México, DF. UNAM, Facultad de Ciencias. 71 p.p.
- Gutiérrez Mariscal M, 2005. Participación de la Hormona Liberadora de Tirotrópina en la conducta de ansiedad. Posgrado en Ciencias Bioquímicas, Instituto de Biotecnología, UNAM. 75 p.p.
- Heinrichs SC, Menzaghi F, Merlo Pich E, Britton KT, Koob GF. 1995. The role of CRF in behavioral aspects of stress. *Ann N Y Acad Sci.* Dec 29; 771: 92-104.
- Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. 2005. Relation between the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (HPA) during repeated stress. *Neuroendocrinology.* 81:183-192.
- Herman JP, Cullinan WE, 1997. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20: 78-84.
- Heuer H, Schäfer M, O'donnell D, Walker, P, Bauer, K. 2000. Expression of the Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor 2 (TRH-R2) in the Central Nervous System of Rats. *The Journal of Comparative Neurology.* 428: 319-336.
- Horita A.1998. An update of the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sciences* 17/18, 1443-1448.
- Imaki T, Katsumata H, Miyata M, Naruse M, Imaki J, Minami S. 2001. Expression of Corticotropin-Releasing Hormone Type 1 Receptor in Paraventricular Nucleus alter acute stress. *Neuroendocrinology* 73: 293-301.
- Joseph P, Charli JL, Palacios JM, Kordon C. 1979. Effect of neurotransmitters on the in Vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 104: 801-806.
- Joseph-Bravo P. 2004. Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone neurons as transducers of energy homeostasis. *Endocrinology* 145 (11):4813-4815.
- Joseph-Bravo P, Cote-Vélez A, Pérez-Martínez L. 2006. Integration of neuroendocrine signals that regulates the activity of hypophysiotropic peptides. *Molecular Endocrinology.*

- Kakucska I, Qi Y, Lechan RM. 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic Thyrotropin Releasing-Hormone gene expression in parallel with Corticotropin-Releasing Hormone. *Endocrinology*. Vol. 136 (7): 2795-2802.
- Kalin NH, Takahashi LK, Chen FL. 1994. Restraint stress increases corticotrophin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain Research* 656: 182-186.
- Kuroda Y, Mc Ewen BS. 1998. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated-protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus. *Molecular Brain Research* 59:35-39
- Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky Ks. 2003. *Williams Textbook of Endocrinology*. Saunders, USA. P.p. 98-112
- Lee SI, Stewart K, Goodman R. 1988. Structure of the encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J. Biol. Chem.*263: 16604-16609.
- Lombardo KA, Herringa RJ, Balachandran JS, Hsu DT, Bakshi VP, Roseboom PH, Kalin NH. 2001. Effects of acute and repeated stress on corticotropin-releasing hormone binding protein mRNA in rat amygdala and dorsal hippocampus. *Neuroscience letters* 302: 81-84
- Lloyd RL, Pekary AE, Sattin A, Amundson T. 2001. Antidepressant effects of thyrotropin-releasing hormone analogues using a rodent model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 70: 15-22.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Lu X, Bidaud I, Ladram A, Gershegorn MC, 2003. Pharmacological studies of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) receptors in *Xenopus laevis*. Is xTRHR3 a TRH receptor? *Endocrinology* 144 (5); 1842-1846.
- Majak K, Pitkanem A. 2003. Projections from the periamygdaloid cortex to the amygdaloid complex, the hippocampal formation, and the parahippocampal region: a PHA-L study in the rat. *Hippocampus* 13(8): 922-42
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pávak K, Plakovits M, Gold PW. 1995. Regulation of Corticotropin-Releasing Hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology* Vol. 136 No.10: 4517-4525
- Maroun, M, Richter-Levin G. 2003. Exposure to acute stress blocks the induction of long-term potentiation of the amygdala-prefrontal cortex pathway in vivo. *The journal of Neuroscience* 23(11): 4406-4409
- Margimegère F, Givalois L, Rage F, Arancibia S, Tapia-Arancibia L. 2003. Rapid induction of BDNF in the hippocampus during immobilization stress challenge in adult rats. *Hippocampus* 13:646-655.
- Mathews CK, Van Holde KE. 1998. *Bioquímica*. Mc Graw Hill Interamericana. España. p.p. 951-952.

- Matsumoto N, Ikebuchi Y, Matsuoka T, Tasaka K, Miyake A, Murata Y. 1997. Involvement of SNAP-25 in TRH-induced exocytosis in pituitary GH4C1 cells. *J Endocrinol.* 153(1):R5-10.
- Mc Ewen BS, Margarinos AM. 1997. Stress effects on morphology and function on the hippocampus. *Ann N Y Acad Sci.* 821, 271-284.
- Mc Ewen BS. 1993. Stress, adaptation, and disease. Mechanisms leading to disease. *Arch. Intern. Med.* 153: 2093-2101.
- Mendez M, Joseph- Bravo P, Cisneros MA, Vargas MA, Charli JL. 1987. Regional distribution of in Vitro release of thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Peptides* 8:291-298.
- Metcalf G. and Dettmar P.W. Is thyrotropin releasing hormone an endogenous ergotropic substance in the brain? *Lancet I*, 586-589, 1981.
- Miwa Y, Koshikawa N, Miyata N, Koshida Y, Kobayashi M, Cools AR. 1995. YM-14673, a thyrotropin-releasing hormone analogue, injected into the nucleus accumbens and the striatum produces repetitive jaw movement in rats. *Eur J Pharmacol.* Apr 13, 277(1): 63-9.
- Mohammad G, Takahashi F, Makurama S. 1999. Induction and adaptation of Fos expression in the rat brain by two types of acute restraint stress. *Brain Research Bulletin* 52 (3): 171-182
- Odell WD, Daughaday WH. 1971. Principles of competitive protein-binding assays. J.B. Lippincott Company. USA. 158-173.
- Pan JT, Lookingland KJ, Moore KE. 1995. Differential effects of Corticotropin-Releasing Hormone on central dopaminergic and noradrenergic neurons. *J Biomed Sci.* 2(1): 50-56.
- Pákač K, Palkovits M. 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocrine Reviews* vo. 22 (4):502-548.
- Palkovits M, Brownstein MJ. 1988. Maps and guide to microdissection of the rat brain. Elsevier Science Publishing Co, Inc. p.p. 87, 96-97,102-103,110-111,124-128,149.
- Palkovits M. 200. Stress-induced expression of co-localized neuropeptides in hypothalamic and amygdaloid neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 405, 161-166.
- Pare WP, Glavin GB. 1986. Restraint stress in biomedical research: a review. *Neurosci Biobehav Rev* 10:339-370.
- Paskitti ME, McCreary BJ, Herman JP. 2000. Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time course analysis. *Molecular Brain Research* 80: 142-152.
- Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th Edition. Academic Press Inc. San Diego, California. p.p. 4-5,9-17,23-47,80-116.
- Pekary AE, Steves SA, Sattin A. 2005. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide levels in rat brain and peripheral tissues by corticosterone. *Neurochemistry International.* p.p. 1-10.
- Pekary AE, Meyerhoff JL, Sattin A. 2000. Electroconvulsive seizures modulate levels of thyrotropin releasing hormone and related peptides in rat hypothalamus, cingulate and lateral cerebellum. *Brain Res.* Nov 24; 884 (1-2): 174-83

- Pérez-Martínez L, Carreón Rodríguez A, González Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph Bravo P. 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interacción with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68: 345-354.
- Prokai, L. 2002. Central nervous system effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogues; opportunities and perspectives for drugs discovery and development. *Progress in drug research.* 50: 133-169
- Raison CL, Miller AH. 2003. When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am J Psychiatry* (160): 1554-1565.
- Rybnicova EA, Pelto-Huikko M, Shaliapina VG. 2001. Early gene expression in the rat brain following administration of cotoliberin in the neostriatum. *Russ Fiziol Zh IM I M Sechenova* 87 (6): 810-814.
- Rubello D, Sovino N, Casara D, Girelli ME, Busnardo B, Boscano M. 1992. Acute and chronic effects of high glucocorticoid levels on hypothalamic-pituitary-thyroid axis in man. *J. Clin. Invest* 15:437-441.
- Sadjyk TJ, Shober DA, Gehlert DR, Shekhart A. 1999. Role of corticotrophin-releasing factor and urocortin within the basolateral amygdale of rats in anxiety and panic responses. *Behavioural Brain Research.* 100, 207-215.
- Salposky RM, Krey LC, Mc Ewen BS, 1984. *Proc Nat Acad Sci. U.S.A.* 81: 6174-6177.
- Sánchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacharias M, Morales-Chapa C, Charli JL and Joseph-Bravo P. 2001. Differential responses of TRH neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the PVN of rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 74: 407-422.
- Saphier D, Feldman S. 1985. Effects on neural stimuli on paraventricular nucleus neurons. *Brain Res.Bull.*14:401-407.
- Seckler T, Kalin NH, and J.M.H.M. Reul (Eds.) 2005. *Handbook of stress and the brain.* Vol.15, Chapter 1.2. The neurophysiology of stress. p.p. 25-42
- Smith J, Yu R, Hinkle PM. 2001. Activation of MAPK by TRH requires clathrin-dependent endocytosis and PKC but not receptor interaction with β -arrestin or receptor endocytosis. *Molecular Endocrinology* 15 (9): 1539-1548
- Simpkins JW, Hodson CA, Meites J. 1978. Differential effects of stress on release of thyroid-stimulating hormone in young and old rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 157:144-147
- Smith MA, Makino S, Kvetnansky R, Post RM.1995. Stress and glucocorticoids affect the expression of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the hippocampus. *J Neurosci* 15:1768-1777
- Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ. 2003. *Fundamental Neuroscience.* Academic Press. 1426 p.p.

- Stocca G. and Nistri A. The neuropeptide thyrotropin-releasing hormone modulates GABAergic synaptic transmission on pyramidal neurones of the rat hippocampal slice. *Peptides*. 17, 1197-202, 1996.
- Sun Y, Lu X, Gershengorn. 2003. Thyrotropin-releasing hormone receptors-similarities and differences. *Journal of Molecular Endocrinology* 30: 87-97
- Swanson LW, Sawchenko PE, Lind RW. 1986. Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Prog. Brain Res.* 68:169-190.
- Thomson BL, Rosen JB. 2000. Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides* 34: 38-44.
- Tsigos C, Chrousos GP. 2003. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53: 865-871.
- Ueyama T, Kawai Y, Nemoto K, Sekimoto M, Toné S, Senba E. 1997. Immobilization stress reduced the expression of neurotrophins and their receptors in the rat brain. *Neuroscience Research* 28:103-110
- Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Mendez M, Covarrubias L, Charli JL. 1991. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 54:493-498
- Yamada M, Radovick S, Wondisfor RE, Kakajawa Y, Weingraub BD, Wilber JF. 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol. Endocrinol* 4:551-556.
- Yu R, Hinkle PM. 1998. Signal transduction, desensitization and recovery of responses to thyrotropin-releasing hormone after inhibition of receptor internalization. *Mol Endocr* 12:737-749.