



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE GENETICA DEL DESARROLLO Y  
FISIOLOGIA MOLECULAR**

**EI ESTRÉS PSICOLÓGICO MODULA LA ACTIVIDAD DE  
LAS NEURONAS TRHérgicas EN EL SISTEMA LÍMBICO**

**TESIS**

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Biol. Arlene Iskra García Vázquez**

Asesora de Tesis: Dra. Patricia Joseph Bravo



Cuernavaca, Morelos

Diciembre del 2006.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular bajo la dirección de la Dra. Patricia Joseph Bravo con el apoyo de la DGAPA (IN-222603) y CONACYT (MRI35896N, 43503Q). Durante la maestría se contó con la beca de postgrado de CONACYT.**

## ÍNDICE GENERAL

---

	Pag.
Lista de abreviaturas	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Tablas	iii
Resumen	iv
<b>I.- Introducción</b>	<b>1</b>
<b>1.- El estrés</b>	<b>1</b>
<b>2.- Respuesta endócrina</b>	<b>2</b>
A) El eje HHA	2
B) El eje HHT	5
<b>3.- Respuesta conductual al estrés psicológico</b>	<b>8</b>
A) El sistema límbico	8
B) El CRH en el sistema límbico y la respuesta conductual al estrés	11
C) El TRH en la respuesta al estrés psicológico	12
<b>II.- Antecedentes</b>	<b>14</b>
<b>III.- Hipótesis</b>	<b>16</b>
<b>IV.- Objetivos</b>	<b>16</b>
<b>V.- Materiales y Métodos</b>	<b>17</b>
<b>1.- Animales</b>	<b>17</b>
<b>2.- Protocolo de estrés por restricción de movimiento</b>	<b>17</b>
<b>3.- Preparación de las muestras</b>	<b>19</b>
<b>4.- Extracción de TRH</b>	<b>19</b>
<b>5.- Análisis estadístico</b>	<b>20</b>
<b>6.- Radioinmunoensayos</b>	<b>20</b>
<b>7.- Extracción de RNA total</b>	<b>22</b>
<b>8.- Cuantificación del RNAm por RT-PCR</b>	<b>24</b>
<b>9.- Análisis de la semicuantificación de RNAm de interés</b>	<b>26</b>
<b>VI.- Resultados</b>	<b>27</b>
<b>1.- Respuesta endócrina</b>	<b>27</b>
A) Actividad del eje HHA	27
B) Actividad del eje HHT	30
<b>2.- Respuesta al estrés en otras regiones del sistema límbico: RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR</b>	<b>32</b>
A) Amígdala	32

B) Corteza prefrontal	34
C) Hipocampo	35
D) Septum	37
E) Tálamo	37
<b>3.- Cambios en los elementos de la transmisión TRHérgica en el Sistema Límbico</b>	<b>37</b>
A) Amígdala	37
B) Corteza prefrontal	38
C) Tálamo	40
D) Septum	41
E) Hipocampo	41
<b>VII.- Discusión</b>	<b>42</b>
<b>1.- Respuesta endócrina</b>	<b>43</b>
<b>2.- Actividad del eje HHT y de las neuronas TRHérgicas del PVN</b>	<b>44</b>
<b>3.-El GR como transductor de los efectos de glucocorticoides</b>	<b>47</b>
<b>4.- Respuesta de las neuronas CRHérgicas y TRHérgicas del sistema límbico</b>	<b>49</b>
<b>5.- Posible significado fisiológico de la activación de las neuronas peptidérgicas en el sistema límbico</b>	<b>50</b>
A) Amígdala	50
B) Corteza prefrontal	52
C) Tálamo	53
D) Circuito septo-hipocampal	55
<b>6.-El TRH como regulador homeostático en el SNC durante situaciones de estrés</b>	<b>56</b>
<b>VIII.- Conclusiones</b>	<b>57</b>
<b>IX.- Bibliografía</b>	<b>58</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

A: adrenalina	NST: núcleo del tracto solitario
ACTH: hormona	PA: adenohipófisis
adrenocorticotropina	PP: lóbulo posterior de la hipófisis
AGRP: proteína reguladora de agouti	PVN: núcleo paraventricular hipotalámico
AM: amígdala	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
BLA: núcleo basolateral de la amígdala	PPII: piroglutamil peptidasa II
BSNT: núcleo basal de la estría terminal	Pro-TRH: precursor del TRH
CART: transcrito regulado por cocaína y amfetamina	RE: restricción de movimiento
CA1: cuerno de Amón 1	RIA: radioinmunoensayo
CA2: cuerno de Amón 2	RNA: ácido ribonucleico
CA3: cuerno de Amón 3	RNA <sub>m</sub> : RNA mensajero
CPF: corteza prefrontal	RT: transcripción reversa
CRH: hormona liberadora de corticotropina	SNC: sistema nervioso central
CRH-R1: receptor 1 de CRH	TAL: tálamo
CORT: corticosterona	T3: triyodotironina
CYC: ciclofilina	T4: tetrayodotironina
DA: dopamina	TR: receptor a hormona tiroidea
DEPC: dietil-pirocarbonato	TRH: hormona liberadora de tirotropina
DN <sub>Ac</sub> : DNA complementario	TRH R1: receptor 1 de TRH
EM: eminencia media	TRH R2: receptor 2 de TRH
G3PDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	TSH: tirotropina
GC: glucocorticoides	PA: adenohipófisis
GR: receptor a glucocorticoides	
HHA: hipotálamo-hipófisis adrenal	
HHT: hipotálamo-hipófisis-tiroides	
HIPO: hipocampo	
HT: hormonas tiroideas	
5-HT: serotonina	
IMO: inmovilización	
MeA: núcleo medial de la amígdala	
MR: receptor a mineralocorticoides	
MSH: hormona estimuladora de melanocitos	
NA: noradrenalina	



## ÍNDICE DE FIGURAS

---

	<b>Pag.</b>
Figura 1. Regulación de la actividad del eje HHA.	3
Figura 2. Estructura química de la hormona liberadora de tiotropina (TRH) y la regulación de la activación del eje HHT.	6
Figura 3. Esquematización del sistema límbico.	9
Figura 4. Esquematización del circuito del estrés.	10
Figura 5. Representación del modelo de restricción de movimiento.	18
Figura 6. Esquematización de la curva estándar y del estándar interno utilizados para el RIA de TRH, CORT y TSH.	22
Figura 7. Se muestra el estado del RNA total extraído de una región representativa.	24
Figura 8. Representación de las cinéticas realizadas para el PVN optimizando el número de ciclos para cada RNAm de interés.	25
Figura 9. Imagen representativa de los productos finales de la PCR para TRH y CYC.	26
Figura 10. Efecto de RE aguda y crónica sobre la actividad del eje HHA.	29
Figura 11. Contenido de TRH y RNAm de pro-TRH y TRH-R1 en el PVN y niveles de TSH, T4 y T3 en suero.	32
Figura 12. Expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la amígdala.	34
Figura 13. Niveles de expresión de los RNAm de pro-CRH y CRH-R1 en la corteza prefrontal.	36
Figura 14. Expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en el hipocampo.	37
Figura 15. Contenido de TRH y expresión del RNAm de pro-TRH, sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 y la PPII en la amígdala.	39
Figura 16. Contenido de TRH y expresión del RNAm de pro-TRH, TRH-R1 y TRH-R2 en la corteza prefrontal.	40
Figura 17. Contenido de TRH y expresión de los RNAm de pro-TRH, sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 en el tálamo	41
Figura 18. Cambios observados en el sistema límbico y en los ejes neuroendócrinos, por efecto de RE aguda y crónica.	42
Figura 19. El TRH como regulador homeostático en el SNC.	56

## ÍNDICE DE TABLAS

---

	<b>Pag.</b>
Tabla 1. Cambios encontrados por efecto de RE aguda y determinados 15 minutos posteriores al estrés .	18
Tabla 2. Cantidad de solución D, acetato de sodio, fenol y cloroformo:isoamílico utilizada en cada región.	23
Tabla 3. Número de ciclos de amplificación por PRC usados para cada gen y región.	26
Tabla 4. Efecto de RE crónica durante 7 o 14 días, sobre la actividad del eje HHA.	30
Tabla 5. Actividad del eje HHT determinada 24 horas post-RE.	32
Tabla 6. Expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la amígdala.	34
Tabla 7. Cambios encontrados en los elementos de la transmisión TRHérgica en la amígdala.	38
Tabla 8. Se muestran los resultados obtenidos en el sistema límbico por efecto de la restricción de movimiento aguda o crónica crónica y los niveles de hormonas en suero.	41

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue comprender el papel del TRH en el sistema límbico durante la respuesta al estrés psicológico, utilizando el modelo de restricción de movimiento (RE). En ratas sometidas a RE, analizamos los cambios en el metabolismo del TRH (contenido del péptido maduro, expresión del pro-TRH, de sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 y de la PPII) en ratas sometidas a RE. Ratas Wistar macho adultas, fueron sometidas a RE por 30 min durante 1 día (agudo) y sacrificadas 45 min post-RE; o sometidas a RE durante 14 días (crónico) y sacrificadas 45 min o 24 hrs post-RE. En estos animales, se cuantificó el contenido de TRH en la eminencia media (EM), en la amígdala, en la corteza prefrontal, en el tálamo, en el hipocampo anterior y posterior y en el septum. En las regiones anteriores y en el núcleo paraventricular (PVN), se determinaron por RT-PCR, cambios en los niveles de expresión del RNAm de pro-TRH, TRH-R1, TRH-R2, PPII, GR, pro-CRH y CRH-R1. Los niveles de corticosterona (CORT) y tirotrópina (TSH) en plasma fueron cuantificados por RIA.

La RE aguda y crónica indujeron activación del eje HHA: incremento en los niveles de CORT en suero. La RE aguda incrementó la expresión de pro-CRH, de CRH-R1 y GR en el PVN, mientras que la RE crónica no afectó la expresión de pro-CRH pero sí la de CRH-R1 y de GR; en estas condiciones el tamaño de la glándula adrenal también se incrementó. En la RE aguda la actividad de las neuronas TRHérgicas en el PVN se encuentra inhibida: aumenta el contenido de TRH en la EM y disminuye la expresión del RNAm de pro-TRH en el PVN. En contraste, la RE crónica disminuyó el contenido de TRH en la EM y los niveles de TSH en suero (a los 45 min post-RE), sin afectar la expresión del RNAm pro-TRH en el PVN. Estos cambios fueron rápidos y transitorios. En ninguna de las condiciones de RE se modificaron los niveles de TSH o de las hormonas tiroideas.

Nuestros resultados muestran que en el sistema límbico, la expresión de los elementos de la transmisión TRHérgica y CRHérgica, son regulados diferencialmente por RE aguda y crónica. En RE aguda, se incrementó la expresión de pro-CRH del PVN y la amígdala, en

contraste, disminuyó la expresión de pro-TRH (y aumentó el contenido de TRH) en el PVN y la corteza prefrontal. En la amígdala sólo se incrementó el contenido de TRH por efecto de RE aguda, pero no la expresión de pro-TRH.

En RE crónica, en la amígdala las neuronas TRHérgicas parecen estar inhibidas: disminuyó la expresión de pro-TRH y se incrementó el contenido del péptido, mientras que la expresión de pro-CRH aumentó. En la corteza prefrontal aumentó la expresión de pro-TRH y de TRH-R2, sin modificarse el contenido de TRH, además disminuyó la expresión de pro-CRH y CRH-R1. En el PVN la actividad de las neuronas TRHérgicas parece estar disminuida (disminuye el contenido de TRH y la expresión del RNAm de pro-TRH), mientras que incrementa la expresión de pro-CRH. En el tálamo, a las 24 hrs las neuronas TRHérgicas posiblemente se encuentran activadas, ya que disminuye el contenido de TRH (aunque la expresión del RNAm de pro-TRH no cambia). En todas estas regiones los cambios en la expresión del pro-TRH fueron rápidos (a los 45 min) y transitorios, implicando regulación neural.

## **I.- Introducción.**

### **I.1- El estrés.**

El estrés es considerado como un estímulo, interno o externo amenazante para la supervivencia del individuo y que provoca cambios fisiológicos, endócrinos y conductuales. Los principales elementos del sistema nervioso central (SNC) que median la respuesta al estrés son el sistema nervioso autónomo (simpático-adrenomedular), el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el sistema límbico (Ramos y Mormede, 1998; Fuchs *et al.*, 2003).

Los estímulos estresantes pueden ser físicos (también referidos como sistémicos, fisiológicos o interoceptivos) o psicológicos (emocionales, procesivos, neurogénicos o exteroceptivos) (Sawchenko *et al.*, 2000). Algunos ejemplos de estrés físico son la exposición al frío, el ayuno, la hipoglicemia, la hemorragia, la hipoxia, estímulos cardiovasculares y reto inmune (Herman *et al.*, 1997 y 2003). Estos activan rutas somáticas y viscerales (como el núcleo del tracto solitario (NST) y el tallo cerebral), que relevan directamente al núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) generando la respuesta rápida fisiológica y endócrina restaurando la homeostasis, que consiste en mantener en un estrecho rango los parámetros fisiológicos vitales para la supervivencia (Herman *et al.*, 2003; McEwen, 2000).

Los estímulos estresantes de tipo psicológico no representan amenaza inmediata a la homeostasis, pero generan una respuesta anticipada en el organismo por lo que dependen en gran medida de la experiencia previa al estrés. A diferencia del estrés físico, la información sensorial y emocional proveniente de los estímulos psicológicos se percibe y procesa en el sistema límbico, donde es organizada e interpretada fisiológica y emocionalmente antes de llegar al PVN e iniciar la respuesta al estrés (Herman *et al.*, 1997; Dayas *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2003). Algunos ejemplos de estrés psicológico son la inmovilización (IMO), la restricción de movimiento (RE), la subordinación social, el miedo condicionado, el nado forzado, el ruido, la exposición a ambientes novedosos o a espacios abiertos y las áreas iluminadas, entre otros (Ramos y Mormede, 1998; Makino *et al.*, 2002).

Las regiones del sistema límbico tienen pocas conexiones directas al hipotálamo y principalmente al PVN, por lo que la información procesada de los estresores psicológicos llega al PVN vía neuronas intermedias como las del núcleo basal de la estría terminal (BSNT).

El hipotálamo es el principal integrador neuroendócrino y el responsable de mantener la homeostasis. Está compuesto de varios núcleos neuronales de los cuales el PVN es fundamental en la respuesta adaptativa a los estímulos estresores, representando la ruta común y final para la integración de la respuesta al estrés. En este núcleo son sintetizados y liberados los factores hipofisiotrópicos que regulan la síntesis y liberación de las hormonas hipofisarias (Fuchs *et al.*, 2003). En este trabajo nos enfocaremos a dos péptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que regulan respectivamente la liberación de corticosterona (CORT) y de las hormonas tiroideas (HT) mediante la regulación del eje HHA y del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT).

## **I.2.- Respuesta endócrina**

### *A) El eje HHA*

La exposición aguda (una sola ocasión y por corto tiempo) a un estresor físico y/o psicológico activa circuitos neuronales particulares provocando la activación del eje HHA (Fuchs *et al.*, 2003). La activación del eje HHA se inicia en la subdivisión parvocelular del PVN donde se sintetiza la CRH y la vasopresina, esenciales para coordinar la respuesta metabólica y conductual al estrés. Después del estímulo estresante hay un rápido incremento en la expresión del RNAm de pro-CRH y de su receptor CRH-R1 en el PVN (Makino *et al.*, 1995), el mensajero de pro-CRH es traducido y procesado y el péptido maduro es transportado a la eminencia media (EM), donde simultáneamente la CRH presente en la terminal sináptica es liberada a la circulación portal, para llegar a la hipófisis estimulando la liberación de la hormona adrenocorticotropina (ACTH). La ACTH actúa sobre la corteza de la glándula adrenal induciendo e incrementando la secreción de glucocorticoides (GC), CORT en rata y cortisol en el humano (Tsigos *et al.*, 2002). Los GC

son el producto final de la activación del eje HHA, actúan sobre varios órganos blanco para movilizar la energía y permitir los cambios adaptativos fisiológicos (Carrasco *et al.*, 2003) (Figura 1).

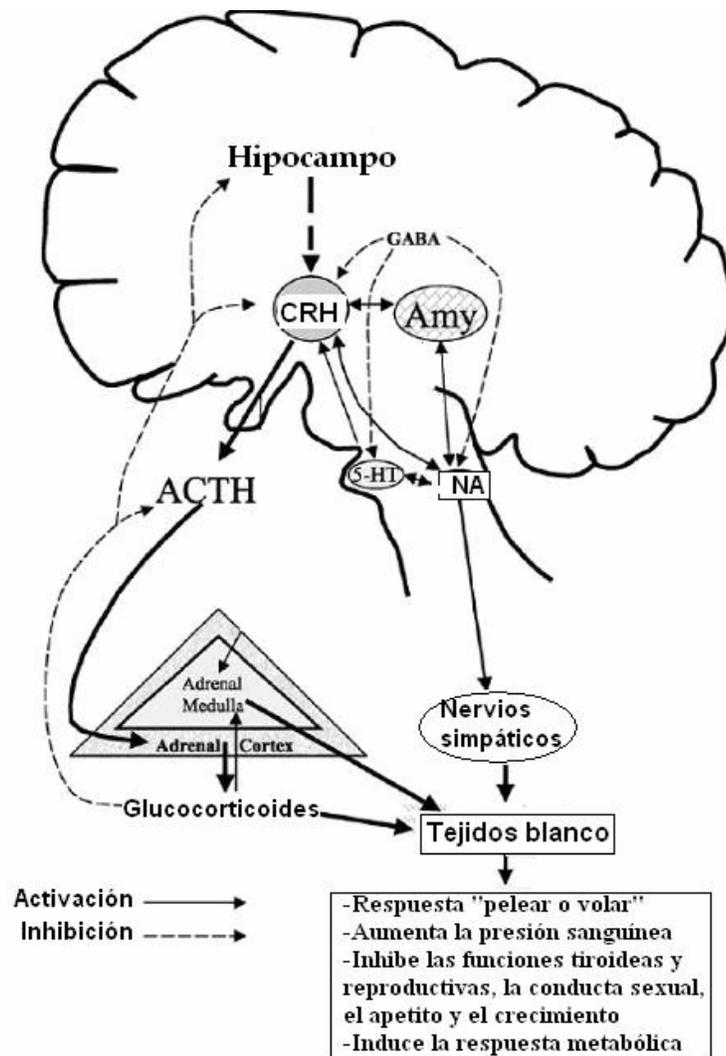


Figura 1. Regulación de la actividad del eje HHA y participación de los glucocorticoides (GC) durante situaciones de estrés. En líneas punteadas (izquierda) se muestra la retroalimentación negativa mediada por GC. Se muestra también la activación de noradrenalina (NA) en el tallo cerebral y su participación en la regulación de la actividad del eje HHA. CRH:hormona liberadora de corticotropina, Amy: amígdala, 5-HT: serotonina, ACTH: adrenocorticotropina. Modificado de Carrasco *et al.*, 2003.

El incremento en los niveles séricos de ACTH y GC así como, el incremento en la expresión de pro-CRH son marcadores importantes de la activación del eje HHA ante situaciones de estrés. La secreción de GC es importante en la respuesta al estrés, sin embargo, la exposición prolongada a elevados niveles de GC tiene efectos negativos en el organismo, promoviendo el desarrollo de enfermedades. En los humanos la exposición prolongada a cortisol induce problemas cardiovasculares, de aprendizaje y memoria, así como tumores en la hipófisis desarrollando obesidad abdominal (síndrome de Cushing). La disminución de los niveles de GC en sangre, por debajo de los niveles basales, induce el desarrollo de patologías psicológicas y emotivas como algunos tipos de depresión (de Kloet *et al.*, 2005). Los GC participan en múltiples funciones incluyendo la memoria mostrando una relación de U invertida en la concentración, es decir, muy altas y bajas concentraciones son deletéreas, por lo que es importante mantener la secreción de GC en niveles óptimos. Los GC controlan la actividad del eje HHA regulando así su propia secreción. Actúan sobre sus receptores localizados en el PVN, la hipófisis y en otras regiones del sistema límbico, inhibiendo la síntesis y liberación de CRH en el PVN y de ACTH de la hipófisis, terminado con al respuesta al estrés (Figura 1). Este mecanismo de regulación es conocido como retroalimentación negativa (Raber *et al.*, 1998; Tsigos *et al.*, 2002).

Los efectos de los GC son mediados por dos subtipos de receptores: el receptor a mineralocorticoides (MR) y el receptor a glucocorticoides (GR). Los MR tienen mayor afinidad por CORT ( $K_d \approx 1$  nM) que GR ( $K_d \approx 5$  nM) y por esta razón los MR están saturados a las concentraciones basales de CORT mientras que GR sólo se satura a concentraciones altas producidas por estrés. Ambos tipos de receptores se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC, los MR están expresados en las regiones del sistema límbico principalmente en el hipocampo mientras que los GR son ubicuos (de Kloet *et al.*, 1998).

*Estrés crónico.* Se refiere a la exposición repetida al mismo estresor induciendo una actividad prolongada o excesiva del eje HHA y por consiguiente hipersecreción de GC. Esto ocurre principalmente por 1) inhibición de la retroalimentación negativa, asociada a una disminución en la expresión de GR en varias regiones claves para la regulación del eje

HHA como el PVN, el hipocampo, la corteza prefrontal y la amígdala; 2) autorregulación de la biosíntesis de CRH en el PVN mediante la sobre expresión de su receptor CRH-R1; 3) el efecto positivo de los GC sobre la expresión de CRH en la amígdala, la cual como se mencionó, tiene efectos positivos sobre la actividad del eje HHA. Los efectos acumulativos de la hiperactividad y secreción de CORT causan incremento del tamaño de la glándula adrenal (hipertrofia) así como disminución del timo, del peso corporal y de la ingesta de comida (Makino *et al.*, 1995 y 2002).

La hiperactividad del eje HHA inducida por el estrés crónico causa atrofia dendrítica en algunas regiones sensibles al estrés como el hipocampo y la corteza prefrontal. Bajo el estrés crónico las respuestas conductuales y fisiológicas están relacionados con el desarrollo de patologías metabólicas como la obesidad, colitis, asma, hipertensión, así como con trastornos emocionales y conductuales como la ansiedad, la depresión, anorexia nerviosa, alteraciones en la memoria y aprendizaje y enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer.

#### B) Eje HHT.

El TRH es un tripéptido (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) (Figura 2A) hipofisiotrópico importante en la regulación neuroendocrina de la homeostasis, regulando la actividad del eje HHT. El TRH fue el primer factor en ser caracterizado químicamente, sintetizado y aislado por su capacidad de estimular la secreción de tiotropina (TSH) (Boler *et al.*, 1969); regula también la síntesis y liberación de prolactina y en casos de trastornos metabólicos o endocrinos (O'Leary y O'Connor, 1995) a la hormona de crecimiento.

Se han caracterizado dos subtipos de receptores para el TRH acoplados a proteínas G, el TRH-R1 y TRH-R2 (Gershengorn y Osman, 1996; Cao *et al.*, 1998) y una ectopeptidasa, la piroglutamil peptidasa II (PPII) responsable de la inactivación extracelular del TRH liberado (Charli *et al.*, 1998).

En respuesta a estímulos neuronales y señales metabólicas el TRH sintetizado en la subdivisión parvocelular del PVN, es liberado a la EM y transportado al lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis) vía el sistema portal hipofisiario. En la adenohipófisis el TRH actúa sobre su receptor TRH-R1 localizado en los tirótropos causando la liberación de TSH,

que a su vez, actúa sobre la glándula tiroides estimulando la síntesis y secreción de las HT: tiroxina (T4) y triyodotironina (T3) (Lechan y Toni, 1992; Joseph-Bravo *et al.*, 1998) (Figura 2B).

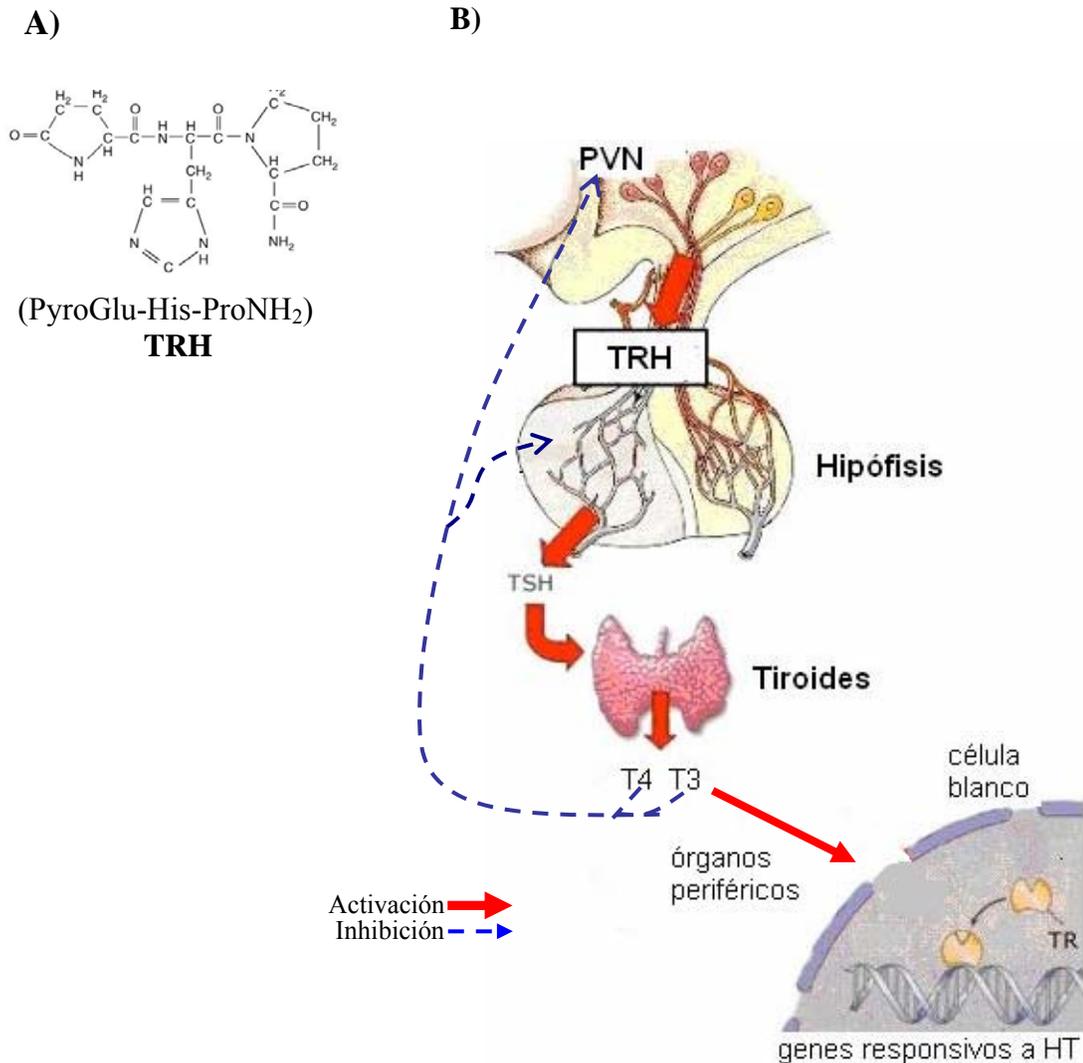


Figura 2. Se muestra la estructura química de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (A) y la regulación de la activación del eje HHT (B). El TRH es sintetizado en la subdivisión parvocelular del PVN y liberado de la EM al sistema hipofisiario, estimulando la secreción de TSH de la hipófisis, que a su vez estimula la secreción de T4 y T3 de la tiroides. En el torrente sanguíneo las HT actúan sobre sus órganos blanco donde regulan la expresión de varios genes; y por retroalimentación negativa (líneas punteadas) la actividad del eje HHT: a nivel del PVN inhiben la síntesis de TRH y a nivel de la hipófisis la secreción de TSH.

Las HT son importantes reguladoras del gasto energético, al ser liberadas al torrente sanguíneo se unen a sus receptores (TR) localizados en células periféricas y centrales regulando así la transcripción de múltiples genes blanco, induciendo la síntesis de enzimas que participan en el metabolismo de carbohidratos y proteínas, estimulando la lipólisis y termogénesis (Yen *et al.*, 2001).

Al igual que el eje HHA, la actividad del eje HHT es regulada por retroalimentación negativa. Cuando los niveles de las HT incrementan, actúan sobre sus receptores localizados en el PVN, inhibiendo la síntesis y liberación de TRH y en la hipófisis, la secreción de TSH restaurando los niveles basales de T4 y T3 (Akil *et al.*, 1999) (Figura 2B).

Aunque el eje HHT no se asocia con los principales sistemas que se activan en el estrés, responde a ciertas condiciones fisiológicas estresantes (donde hay incremento en los niveles de CORT sérica) como la exposición al frío (Arancibia *et al.*, 1989), la succión (Uribe *et al.*, 1993), y es regulado por el estado metabólico del organismo (de Gortari *et al.*, 2000). En situaciones de ayuno disminuye la expresión del RNAm de pro-TRH en el PVN e incrementa el contenido del péptido madura (TRH) en la EM, implicando disminución en su liberación hacia la circulación portal hipofisiaria (Van Haasteren *et al.*, 1995; de Gortari *et al.*, 2000) por consiguiente, disminuyen los niveles de TSH y hormonas tiroideas séricas (Blake *et al.*, 1991; Van Haasteren *et al.*, 1995; Legardi *et al.*, 1997). El metabolismo del TRH también se ve afectado (dependiendo de la edad) en la amígdala, donde disminuye el contenido de TRH y los niveles de su RNAm (de Gortari *et al.*, 2000). Estos datos indican que el eje HHT y las neuronas TRHérgicas del PVN responden a ciertas condiciones de estrés físico metabólico.

El estrés psicológico también modula la actividad del eje HHT. El estrés agudo por IMO (2 hrs) inhibe la actividad del eje HHT: incrementa el contenido de TRH en la EM, disminuyen los niveles del RNAm de pro-TRH en el PVN y los niveles séricos de TSH y de T4 (Cizza *et al.*, 1996). Estresores psicológicos menos severos como RE aguda por 30 min tiene los mismo efectos inhibitorios sobre la actividad del eje HHT a los 15 min post-RE reportados para IMO exceptuando la disminución en los niveles de T4 sérica (Rebolledo, 2006).

El papel neuroendócrino del TRH ha permitido conocer mejor el funcionamiento de la neurona peptidérgica porque se conoce su célula blanco en la hipófisis. Por estudios *in vitro* en cultivos celulares de hipófisis se ha demostrado que los receptores a pro-TRH son regulados homóloga y hererológamente. En la primera condición, la incubación con TRH induce una rápida (2-3 min) internalización del complejo ligando-receptor vía vesículas cubiertas de clatrina (Ashworth *et al.*, 1995); si la estimulación continúa, el TRH disminuye la tasa de transcripción del gen del receptor y disminuye la estabilidad del RNAm, incrementando su degradación (Fujimoto *et al.*, 1992). Disminuye además la expresión de la PPII y su actividad (Vargas *et al.*, 1994). Heretológamente la proteína y el RNAm de los receptores a TRH en la hipófisis son regulados por varias hormonas como T3 y GC. La expresión del RNAm y la cantidad de receptores en la membrana celular disminuyen por T3 y son estimulados por GC (Gershengorn, 1993).

### **I.3-. Respuesta conductual al estrés psicológico.**

#### *A) El sistema límbico.*

Es la región del SNC donde se generan las emociones, los estados de ánimo y la conducta; también es importante en la manifestación e integración de los mecanismos cognitivos y motores. Está formado por las siguientes regiones: la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal, el septum, el tálamo y el hipotálamo (Dalglish, 2004; Morgane *et al.*, 2006) (Figura 3). El sistema límbico es importante para mediar las respuestas conductuales al estrés mediante la activación del sistema CRHérgico en estas regiones.

El hipocampo es fundamental en los procesos de aprendizaje y memoria; consta de tres dominios CA1, CA2 y CA3, el giro dentado y el subículum (Amaral y Witter, 1995). Por otra parte, el septum, formado por varios núcleos (medial, lateral, posterior, ventral) participa en la regulación de los estímulos emocionales aversivos (Yadin *et al.*, 1996), mitiga la conducta de ansiedad inducida por estrés social psicológico (confrontación social) (Calfa *et al.*, 2006); modula la actividad excitatoria de las neuronas del hipocampo y neocorteza asegurando el procesamiento normal de la información emocional y los procesos de memoria y aprendizaje (Colom *et al.*, 2006).

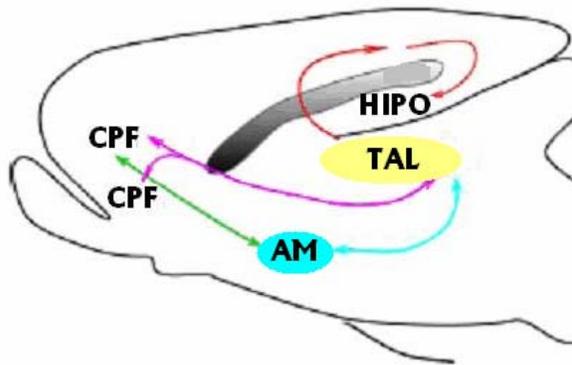


Figura 3. Esquemización del sistema límbico. Se muestran las principales regiones que conforman el circuito del estrés así como sus interconexiones. AM: amígdala, HIPO: hipocampo, TAL: tálamo, CPF: corteza prefrontal. Modificado de Morgane *et al.*, 2006.

La amígdala está involucrada en el procesamiento y consolidación de la memoria emotiva y de otros tipos de memoria dependientes del hipocampo, en la generación y manifestación del miedo y es la principal región involucrada en la conducta de ansiedad. Está formada por tres núcleos: central (CeA), medial (MeA) y basolateral (BLA). (Quirk *et al.*, 2003; Akirav *et al.*, 2005). La corteza prefrontal es una región heterogénea formada por varias sub-regiones (prelímica, infralímbica, cingulada y granular); recibe impulsos de las cortezas motoras, somatosensora, visual y auditiva; está involucrada en procesos cognitivos como la memoria de ejecución de tareas y la atención, en mecanismos de recompensa, en la conducta de alerta y miedo (Morgane *et al.*, 2006). Por otra parte, el tálamo está involucrado en los estados de alerta, regula los periodos de vigilia-sueño y es importante sobre todo en la respuesta al estrés crónico (Suárez *et al.*, 1998); consta de varios núcleos de los cuales el paraventricular posterior está involucrado en contrarrestar la conducta de ansiedad (Bhatnagar *et al.*, 2003).

#### *Circuito límbico del estrés.*

Las regiones mencionadas están comunicadas anatómicamente y funcionalmente por medio de proyecciones neurales, constituyendo un circuito que integra la información sensorial y emotiva generando de manera conjunta las respuestas conductuales al estrés (Figura 4). Muchos impulsos sensoriales llegan al tálamo, sitio clave de relevo de la información sensorial hacia la corteza y la amígdala (LeDoux *et al.*, 1990). La corteza prefrontal se

comunica directamente con el septum, la amígdala e hipocampo (LeDoux *et al.*, 1995). La información sensorial proveniente del tálamo y de la corteza prefrontal, y la información cognitiva proveniente del hipocampo, llega a los núcleos BLA de la amígdala donde se integra y decodifica. De los núcleos BLA pasa a los CeA y de ahí salen hacia otras regiones límbicas (Wallace *et al.*, 1992). además de estas interconexiones, se pueden reconocer circuitos involucrados en la regulación de ciertas conductas específicas, como el circuito hipotalámico-septum-amígdala involucrado en los procesos de consolidación de la memoria y el aprendizaje, y el circuito formado por las conexiones entre la amígdala-corteza prefrontal-tálamo involucrado en la generación y extinción de la conducta de miedo y ansiedad (Shulkin *et al.*, 2005), posiblemente contrarrestando la función de la amígdala, región clave en estas conductas (Quirk *et al.*, 2003).

Estas regiones modulan la actividad del eje HHA; la amígdala tiene efectos estimulatorios mientras que el hipocampo (Cone *et al.*, 2003), la corteza prefrontal (Morgane *et al.*, 2005), el septum (Dunn *et al.*, 1987) y el tálamo (Bhatnagar *et al.*, 2003), inhibitorios (Figura 4).

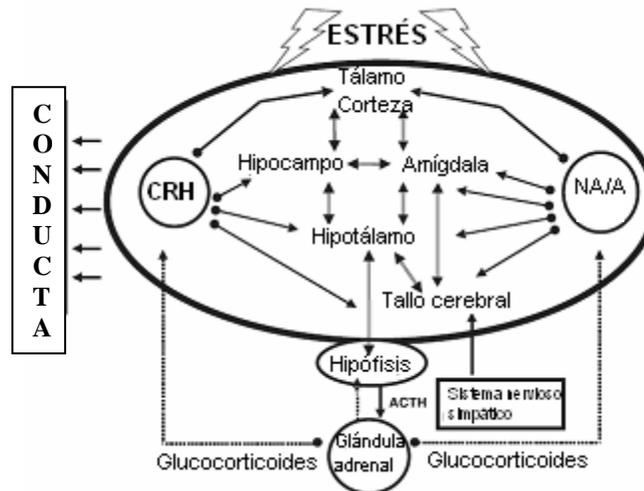


Figura 4. Esquemización del circuito del estrés. Las regiones del sistema límbico están conectadas entre sí y con el hipotálamo. El CRH, actuando en este circuito y en el hipotálamo media los aspectos conductuales y fisiológicos de la respuesta al estrés. El estrés también activa el sistema adrenalina (NA)/noradrenalina (A) contribuyendo a la respuesta al estrés. Modificado de Fuchs *et al.*, 2003.

## **B) El CRH en el sistema límbico y la respuesta conductual al estrés.**

El CRH es un polipéptido de 41 aminoácidos, derivado de una proteína precursora de 196 aminoácidos, considerado como la molécula más importante que interviene en la respuesta neuroendócrina, autonómica y conductual al estrés (Coste *et al.*, 2001). Se encuentra ampliamente distribuido en el SNC, y son las neuronas parvocelulares del PVN hipotalámico la principal fuente de CRH. Fuera del hipotálamo, el CRH se expresa en regiones del circuito del estrés como la amígdala (donde CeA es la región con mayor expresión de CRH extra-hipotalámico) (Van Bockstaele *et al.*, 1998), el hipocampo, la corteza prefrontal, el tálamo, el septum y el núcleo accumbens (Swanson *et al.*, 1983; Chang y Opp, 2001). En estas regiones el CRH está involucrado en la expresión del miedo, la consolidación de la memoria y el aprendizaje así como en la conducta de ansiedad (Figura 4).

Los efectos del CRH son mediados a través de dos receptores acoplados a proteínas G denominados CRH-R1 y CRH-R2; los cuales son expresados diferencialmente en regiones del SNC que también expresan CRH. El CRH-R1 se localiza en la corteza prefrontal, la amígdala, el hipocampo y se expresa en poca cantidad en el PVN, entre otras regiones. El CRH-R2 se encuentra principalmente en estructuras subcorticales y en tejidos periféricos y se expresa poco en el sistema límbico. El CRH tiene mayor afinidad por el CRH-R1 que por el CRH-R2 (Lovenberg *et al.*, 1995).

En la rata, los efectos del CRH como neuromodulador y su participación en la respuesta conductual al estrés están bien documentados. La administración central de CRH o de sus agonistas reproducen las conductas adaptativas mediadas por la activación de CRH durante el estrés (aumento en la actividad locomotora, conducta de acicalamiento, postura en dos patas, incrementa el sobresalto acústico) además mejora la retención en tareas de aprendizaje (Arborelius *et al.*, 1999; Smagin *et al.*, 2001). Los ratones transgénicos que sobre-expresan el péptido presentan alteraciones en las respuestas endócrinas (Heinrichs *et al.*, 1997; Van Gaalen *et al.*, 2002) y conductuales al estrés como la conducta de ansiedad exacerbada (Dunn y Berridge, 1990). El CRH-R1 media los efectos del CRH en la conducta de ansiedad; los ratones nulos para el gen de este receptor, muestran reducida conducta de ansiedad mientras que la inhibición de su expresión o el uso

de antagonistas tienen efectos ansiolíticos y antidepresivos (Coste *et al.*, 2001). Por otra parte al CRH-R2 se le ha involucrado en mediar la conducta anorexigénica del CRH.

### **C) El TRH en la respuesta al estrés psicológico.**

El TRH es sintetizado como un precursor de alto peso molecular (26000 Da). En la rata este precursor tiene repetida cinco veces la secuencia Gln-His-Pro-Gly flanqueada por residuos básicos. La hidrólisis secuencial de estos residuos por una convertasa y una carboxipeptidasa produce Gln-His-Pro-Gly; la glutamil ciclasa convierte el residuo de Gln a piro-Glu y la peptidilglicina  $\alpha$ -amidasa monooxigenasa escinde los carbonos de la glicina (Gly) dejando el grupo amida (TRH: pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) (Joseph-Bravo *et al.*, 1998).

Al igual que el CRH, el TRH está presente en varios núcleos hipotalámicos y enriquecido en las neuronas parvocelulares del PVN, las cuales proyectan sus terminales nerviosas a la EM ejerciendo funciones hipofisiotrópicas (Lechan *et al.*, 1986). Fuera del hipotálamo, el TRH, sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 y la PPII están presentes en varias regiones del sistema límbico y en particular del circuito del estrés (Lechan *et al.*, 1986; Cao *et al.*, 1998; Heuer *et al.*, 2000). En la amígdala, el hipocampo y el tálamo se expresan presentes todos los elementos de la transmisión TRHérgica aunque en diferentes núcleos. En particular los receptores a TRH tienen una distribución mutuamente excluyente. En la amígdala el TRH sólo se expresa en los núcleos BLA donde también se localiza el TRH-R2 mientras que el TRH-R1 está presente en CeA y MeA. En el hipocampo el TRH sólo se expresa en el giro dentado y en el subículum, el TRH-R2 sólo en el subículum. El tálamo es la región con mayor expresión de TRH-R2; el TRH sólo se encuentra en los núcleos reticulares y el TRH-R1 en los núcleos paraventriculares. En la corteza prefrontal y el septum se expresan los receptores a TRH y la PPII, pero no hay RNAm de TRH, aunque sí hay terminales nerviosas con el péptido maduro de TRH (Lee *et al.*, 1988; Calza *et al.*, 1992; Heurer *et al.*, 2000; O'Dowd *et al.*, 2000). El RNAm de la PPII es abundante en la corteza y en las neuronas piramidales hipocampales (Heurer *et al.*, 2000) mientras que se expresa muy poco en el septum, la amígdala e hipotálamo.

### *Papel fisiológico del TRH del Sistema Límbico.*

La amplia distribución del TRH, sus receptores y la PPII en el sistema límbico sugieren que la función de este péptido va más allá de su papel clásico como regulador neuroendocrino. Estudios farmacológicos apoyan su papel como neuromodulador en el SNC. Sin embargo, y a diferencia del CRH, no se conocen bien las regiones en las que el TRH ejerce sus efectos neuromoduladores.

En la rata, estudios *in vivo* muestran que la administración sistémica o central del TRH o de sus análogos sintéticos, reduce el sobresalto acústico (ocasionado por un paradigma de miedo condicionado), incrementa los estados de alerta y la actividad locomotora (Thompson y Rosen, 2000), reduce la ingesta de agua y comida sugiriendo su participación en la anorexia nerviosa (Strupp y Levitsky, 1983; Pollit, 1996), además, reduce la narcosis producida por el etanol (French *et al.*, 1993) y los barbitúricos (Hashimoto *et al.*, 1993) sugiriendo el papel del TRH en los estados de alerta. El circuito septo-hipocampal media los efectos analépticos del TRH (Morzorati *et al.*, 1993). El TRH también tiene efectos electro-convulsivos, antiepilépticos y antidepresivos cuando se inyecta en la amígdala, corteza e hipocampo donde también mejora la memoria y el aprendizaje (Horita, 1998; Nillni y Severino, 1999).

*In vitro* el TRH controla la actividad excitatoria de las neuronas del tálamo (Broberger *et al.*, 2005) y del hipocampo (Stocca y Nistri, 1996). También por estudios *in vitro* se vió que la actividad de las neuronas TRHérgicas del septum, provenientes de ratas sometidas a IMO 2 hrs durante 7 días en respuesta al etanol, liberan mayor cantidad de TRH que las ratas control (Kiss *et al.*, 2004). Los efectos farmacológicos del TRH en el SNC son mediados a través de varios sistemas de neurotransmisores como la catecolamina, la dopamina y la acetilcolina (Horita, 1998).

## II.- Antecedentes

El objetivo principal de nuestro laboratorio es dilucidar los mecanismos que intervienen en regular la función de la neurona TRHérgica en el sistema límbico. Los GC regulan la transmisión del TRH y si bien, el eje HHT no se ha asociado con los principales sistemas que responden al estrés, su actividad está modulada por condiciones en las que también hay activación del eje HHA (incremento en los niveles de CORT sérica y del RNAm de pro-CRH en el PVN); como ocurre durante el estrés por frío, la succión (Uribe *et al.*, 1993) y el ayuno (Van Haasteren *et al.*, 1995; Brady *et al.*, 1990).

El estrés por frío o por estímulos neurales como la succión (Uribe *et al.*, 1995), causan liberación del TRH de la EM (Zoeller *et al.*, 1995) e incremento rápido y transitorio de la expresión del RNAm de pro-TRH (Uribe *et al.*, 1993) en zonas específicas del PVN (Sánchez *et al.*, 2001). Además, durante la exposición al frío se incrementan los niveles de TSH y de HT (Uribe *et al.*, 1993) mientras que en respuesta a la succión se libera prolactina. En conjunto la regulación del eje HHT por el frío y la succión nos permite asociar, que en este circuito neuroendócrino, la liberación del péptido TRH es concomitante a la síntesis de su precursor (pro-TRH), y que la célula blanco responde al TRH liberado, regulando la secreción de TSH, así como la expresión de sus receptores (TRH-R1 y TRH-R2) y de la PPII.

Como se mencionó en la introducción, el estrés psicológico agudo por IMO (2 hrs) o RE (30min y sacrificando 15 min después) modulan la actividad del eje HHT y de las neuronas TRHérgicas del PVN. Sin embargo, se sabe poco sobre la modulación de la actividad de estas neuronas en el sistema límbico, durante situaciones de estrés psicológico agudo y crónico.

Se ha visto que las neuronas TRHérgicas se activan por la estimulación eléctrica o química (kindling), incrementa el contenido de TRH y la expresión del RNAm su precursor en la amígdala, hipocampo y corteza prefrontal. Además, en estas regiones disminuye la expresión del RNAm de TRH-R1, TRH-R2 y de la PPII (de Gortari *et al.*, 1995 y 2005), la cual también es modulada por la inyección aguda de etanol (de Gortari *et al.*, 2000). En analogía con lo descrito para el eje HHT, los cambios en la respuesta de TRH, sus receptores y la PPII permiten asumir que las neuronas TRHérgicas se encuentran activadas.

Como se mencionó en la introducción el TRH administrado centralmente (i.c.v.) tiene diferentes efectos conductuales, sin embargo no se ha descrito la participación del TRH endógeno. En un intento por dilucidar su participación y en función al papel atribuido al TRH como ansiolítico, en el laboratorio se utilizó el modelo conductual de enterramiento defensivo (modelo de ansiedad). El modelo contiene un estímulo físico estresante (choque eléctrico), aumentando los niveles de CORT sérica y modificando la actividad de las neuronas TRHérgicas en varias regiones del sistema límbico. En la amígdala se incrementa el contenido de TRH (a los 30 min) y disminuye la expresión de su RNAm (30 y 60 min después de terminada la prueba) sugiriendo que las neuronas TRHérgicas en esta región se encuentran inhibidas, correlacionando con el estado de ansiedad. En este paradigma conductual fue sorprendente que en el PVN se incrementaran los niveles del RNAm de pro-TRH (a los 30 y 60 min), a pesar de que el modelo de ansiedad no implica una respuesta metabólica, confirmado al no modificarse la actividad del eje HHT. La inyección i.c.v. del TRH en ratas sometidas a la prueba de enterramiento defensivo, disminuye la conducta de ansiedad, sin afectar la actividad del eje HHT (Gutiérrez Mariscal, 2005). Estos datos sugieren que el TRH en el sistema límbico está involucrado en las respuestas a estímulos estresantes y en la amígdala en la conducta de ansiedad y miedo, y que sus efectos son independientes de su función endócrina.

Hasta ahora se había considerado al eje HHT como el responsable del metabolismo basal y al eje HHA como el responsable de la respuesta al estrés. Sin embargo resulta evidente que el estrés está afectando la actividad del eje HHT y de las neuronas TRHérgicas en el PVN y otras regiones del circuito del estrés. Este proyecto intenta determinar si el contenido de TRH, la expresión de pro-TRH, de sus receptores y de la PPII se modifica en el sistema límbico en situaciones de estrés psicológico.

### **III.- Hipótesis.**

1.- Si las neuronas TRHérgicas del sistema límbico están involucradas en la respuesta al estrés psicológico, su actividad se modificará. En ratas sometidas a estrés psicológico, cambios en las concentraciones de TRH, del RNAm de pro-TRH, TRH-R1, TRH-R2 y PPII en las regiones del circuito del estrés, nos permitirán evidenciar modificación en la actividad de las neuronas TRHérgicas.

### **IV.- Objetivos.**

#### General

Comprender la participación del TRH en el sistema límbico en la respuesta al estrés psicológico agudo y crónico.

#### Particulares

- 1.- Determinar cambios en el contenido de TRH y en los niveles de expresión del RNAm de pro-TRH, de sus receptores y de la PPII en las regiones del sistema límbico involucradas en el circuito del estrés, en ratas sometidas a restricción de movimiento (RE) agudo y crónico.
- 2.- Distinguir la participación de las neuronas TRHérgicas de un efecto neural inmediato, a uno a largo plazo, que pudiera ser consecuencia del incremento en los GC.
- 3.- Cuantificar cambios en los niveles de expresión de pro-CRH y de CRH-R1 como un control de activación del circuito de estrés.
- 4.- Comparar la respuesta de las neuronas TRHérgicas y las CRHérgicas, tomando como parámetros los cambios en la expresión del RNAm de su precursor y de sus receptores correspondientes.

## **V.- Materiales y Métodos.**

### **V.1. Animales.**

Se utilizaron ratas macho adultas Wistar de 300-350 g, mantenidas 5-6 ratas por caja en un cuarto con temperatura controlada y periodo de luz-oscuridad de 12 hrs (luz: 7-19 h) y con acceso *ad libitum* de agua y comida.

### **V.2.- Protocolo de estrés por restricción de movimiento (RE).**

Para entender el papel del TRH del sistema límbico en la respuesta al estrés se utilizó el modelo de estrés psicológico por restricción de movimiento, que no implica daño o dolor para el animal, pero a diferencia del estrés puramente psicológico (como la exposición a depredadores) la RE involucra un componente físico que limita las respuestas defensivas del organismo (McIntyre *et al.*, 1999). Estos elementos hacen de la RE un paradigma adecuado para evaluar los efectos del estrés en las emociones, conductas o en el aprendizaje y la memoria.

El protocolo se realizó en el periodo de luz entre las 9:30 y las 11:00 am en un área distinta del cuarto donde se mantiene a las ratas y del cuarto de sacrificio. La restricción de movimiento se logra introduciendo a la rata en un tubo de plexiglas transparente de 23.5 cm de largo y 7 cm de diámetro. El tubo tiene ranuras a distintas longitudes y una tapa del mismo material que permite ajustar el largo del tubo a 14 cm aproximadamente, evitando así que la rata se mueva hacia delante o hacia atrás (Figura 5A).

En el laboratorio se ha visto que a los 15 min después de una sesión de RE hay un pico altamente significativo en los niveles de CORT en suero ( $413 \pm 46\%$ ,  $p < 0.0001$ ), regresando a valores similares a los basales 45 min después (Tabla 1). Sin embargo, los efectos sobre la expresión de los genes de estrés CRH, CRH-R1 y GR son detectables sólo hasta los 45 min post-RE. Por esta razón se decidió determinar los efectos de RE sobre la expresión génica a tiempos cortos de sacrificio (45 min después de la sesión de RE), además porque la expresión del RNAm de pro-TRH en el PVN es modulada rápida y transitoriamente en paradigmas como la succión, el frío y la administración de etanol.

Efecto de RE aguda sobre la actividad del eje HHA				
	CORT	Pro-CRH	CRH-R1	GR
CI	100 ± 12	100 ± 5	100 ± 7	100 ± 10
RE	413 ± 46 ***	76.7 ± 9	100 ± 7	77 ± 8

Tabla 1. Cambios encontrados por efecto de RE aguda y determinados 15 minutos posteriores al estrés. Todos los valores mostrados son la media ± ESM. \*\*\* p<0.0001. CI= control intacto; RE= grupo experimental. Datos obtenidos por Daniela Rebolledo, 2006. Tesis de Licenciatura, UNAM.

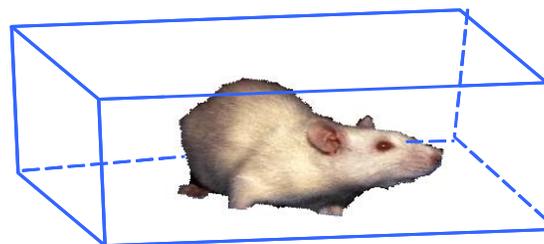
La RE implica, además de restringir el movimiento, aislar al animal del resto del grupo de ratas. Con el objetivo de determinar si los cambios observados por efecto de RE son debidos a la restricción y no al aislamiento, decidimos incluir un grupo control en el cual los animales serían aislados durante el mismo tiempo.

Los animales fueron divididos en dos grupos, uno para el paradigma de RE aguda y el otro para RE cónica. Cada grupo se dividió en tres subgrupos: a) grupo experimental sometido a RE, b) control aislado y c) control intacto.

a) *RE aguda*. Las ratas fueron sometidas a restricción por 30 min y sacrificadas 45 min después de terminada la sesión (post-RE). b) *RE crónica*. En este protocolo los animales fueron sometidos a restricción 30 min al día durante un periodo de 7 o 14 días y sacrificadas 45 min o 24 hrs después de la última restricción. En el caso del protocolo de 7 días los animales fueron sacrificados 24 hrs después.



Figura 5. A) Representación del modelo de restricción



B) Representación del control aislado.

b) Control aislado (CA). Un equivalente número de ratas se pusieron en cajas individuales por el mismo tiempo y durante los mismos días que el grupo experimental (Figura 5B).

c) Los animales del grupo control intacto (CI) permanecieron en el cuarto habitual en su caja y solo fueron manipuladas y sacadas del cuarto para pesarlas y el día del sacrificio. Todos los grupos control fueron sacrificados al mismo tiempo que sus grupos experimentales.

Para el paradigma de RE crónica, antes de iniciar el protocolo las ratas de los grupos CI, CE y RE se pesaban y se registraba la cantidad de alimento consumido.

### **V.3.- Preparación de las muestras.**

Los animales fueron sacrificados por decapitación a las 9:30-11:00 am. Se colectó la sangre del tronco y se mantuvo a 4°C, se centrifugó a 5000 x g durante 10 min y se separó el suero. El suero se almacenó en alícuotas a -20°C. Los cerebros se extrajeron y se disecó la eminencia media (EM) en fresco, inmediatamente los cerebros y la EM fueron congelados y guardados a -70°C. Finalmente, sólo del grupo de 14 días se disecó la glándula adrenal y se pesó.

*Disecciones.* A partir de los cerebros congelados y con base en las coordenadas y referencias anatómicas reportadas en el atlas de Palkovits (Palkovits y Brownstein, 1988) se disecaron mediante cortes manuales las siguientes regiones: corteza frontal, septum, tálamo, hipocampo anterior, hipocampo posterior. La amígdala y el PVN fueron obtenidos con un sacabocados de 2 y 1 mm de diámetro respectivamente; abarcando sólo la amígdala (eliminando la parte de corteza) y al PVN a ambos lados del tercer ventrículo. Las demás regiones disecadas fueron divididas en izquierda y derecha. La mitad izquierda se utilizó para el análisis semicuantitativo por RT-PCR de la expresión del RNAm de pro-TRH, sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 y de la PPII; así como del mensajero de los genes marcadores de estrés pro-CRH, CRH-R1 y GR. El lado derecho se utilizó para extraer y determinar el contenido de TRH por radioinmunoensayo (RIA).

### **V.4.-Extracción de TRH.**

Todas las muestras fueron homogenizadas en 500 µl de ácido acético al 20%. Del homogenado se tomó 30 µl para cuantificar proteína por el método de Lowry. El volumen

restante se centrifugó a 20800 x g por 20 min a 4°C. Al sobrenadante (420 µl) se le agregó 800 µl de metanol al 100% y se guardaron a -20°C toda la noche. Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 10500 x g durante 20 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se evaporó el metanol en un concentrador por vacío (Speed Vac Concentrador Savant). El sedimento se guardó a -20°C hasta ser utilizado.

#### **V.5.- Análisis estadísticos.**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una y dos vías y la prueba Post-Hoc de Fisher, se consideró  $p < 0.05$  como significativo. En algunos casos los datos se analizaron mediante una prueba de t de dos colas y  $p < 0.05$  como significativo.

#### **V.6.- Radioinmunoensayos (RIA).**

La concentración de TRH en cada región y los niveles de CORT y TSH en suero fueron determinados por RIA. En los tres ensayos la curva estándar y los controles fueron preparados por triplicado de la siguiente manera:

- Cuentas por minuto (cpm) totales: sólo contienen la marca radiactiva respectiva para cada hormona (TRH:  $I^{125}$ -TRH; CORT: 3H-corticosterona y TSH:  $I^{125}$ -TSH).
- Unión inespecífica (NSB): se les adicionó buffer de RIA (10 mM de fosfatos, pH 7.5, 150 mM de NaCl y 0.1% de gelatina de piel de becerro) y la marca radiactiva correspondiente para cada ensayo.
- Bo: contienen buffer de RIA, el anticuerpo para cada hormona y la marca radioactiva respectiva.
- Curva estándar: se prepara con diluciones de la hormona a cuantificar en las siguientes concentraciones 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg, más el anticuerpo y la marca radioactiva correspondientes.
- Control estándar interno: se incluyó este control para verificar el paralelismo en la curva estándar y para calcular variaciones inter-ensayos. Consiste de muestras provenientes de hipotálamo (para TRH) o de suero (para CORT y TSH) de rata diluidos en 50, 100, 250, y 500 µl, más buffer de RIA, el anticuerpo y la marca radioactiva respectiva.

*a) TRH.*

Para esta hormona el sedimento se resuspendió en 500 µl de buffer de RIA para la EM y 250 µl para las demás regiones. Los tubos se agitaron y centrifugaron 5 min a 10500 x g a temperatura ambiente. Del sobrenadante se tomó 100 µl por duplicado de cada muestra, y se le adicionó la mezcla de incubación: 100 µl de anticuerpo contra TRH y buffer de RIA con 100 µl de I<sup>125</sup> TRH; se dejó incubando a 4°C durante 36-48 hrs. Posteriormente a todas las muestras, exceptuando las cuentas totales, se les adicionó 1 ml de etanol frío y se centrifugaron a 980 x g por 30 min a 4°C. El sobrenadante obtenido se succionó con un extractor en la cámara de RIA y del precipitado se leyó las cpm en un aparato de conteo de radiaciones gama (LKB Wallace Miligama Counter).

*b) CORT.*

Se realizó una dilución 1:1000 de todos los sueros tomando 10 µl y 5 ml de buffer de RIA y se calentaron en un baño con agua a 98°C por 10 min. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se tomaron 500 µl y se le adicionó: 100 µl de anticuerpo contra CORT previamente diluido a 1:1200 y 100 µl de 3H-Corticosterona (ICN Farmaceutica) equivalentes a 10000 cpm. Las muestras se agitaron y dejaron incubando a 4°C por 18-24 horas. Transcurrido ese tiempo a los tubos, exceptuando a los de cpm totales, se les adicionó 200 µl de Carbon-Dextran (ICN Farmaceutica), se agitaron e incubaron a 4°C por 20 min. Posteriormente se centrifugaron a 980 x g por 15 min, el sobrenadante fue transferido a viales especiales para conteo de radiaciones β y se les adicionó a cada vial 4 ml de líquido de Centelleo, incluyendo a los tubos de cpm totales. Se contaron las cpm en un Contador β (Beckman).

*C) TSH.*

Se realizó una dilución 1:1 de todas las muestras de suero por duplicado tomando 100 µl de suero y 100 µl de buffer de RIA y 100 µl de anticuerpo TSH diluido previamente a 1:375000 en buffer de RIA. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente durante 18-24 hrs. Posteriormente se les adicionaron 10000 cpm/100 µl de TSH, previamente iodada (<sup>125</sup>I-TSH) por el método de Cloramina-T; se dejaron incubando a temperatura

ambiente por 18-42 hrs. Transcurrido este tiempo se les adicionaron 100  $\mu$ l de suero de cabra anti IgG de conejo al 2.5% en PBS y 100  $\mu$ l de suero normal de conejo al 2% en PBS dejando incubar por 2 hrs. Los tubos fueron centrifugados a 980 x g por 30 min. Se aspiró el sobrenadante con un extractor en la cámara de RIA y del precipitado se leyeron las cpm en el aparato de conteo de radiaciones gamma.

Finalmente el contenido de TRH (pg), la concentración sérica de CORT (ng/ml) y TSH (ng/ml) fueron calculados a partir del valor en cpm de las curvas estándar y de las muestras problema utilizando el Software (enri) que calcula la función logit-log (Figura 6).

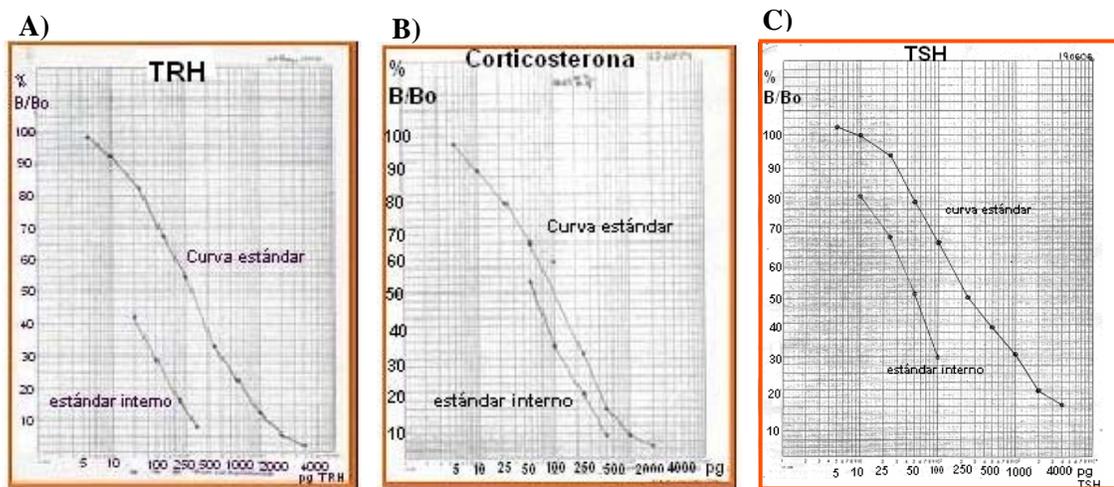


Figura 6. Esquematización de la curva estándar y del estándar interno utilizados para el RIA de TRH (A), CORT (B) y TSH (C). Cada punto de la gráfica fue calculado con la fórmula  $B = (cpm - NSB) / Bo$ .

### V.7.- Extracción de RNA total.

Para extraer el RNA total se utilizó el método de tiocianato de guanidina descrito por Chomczynski en 1987 con algunas modificaciones (de Gortari *et al.*, 2006). Los tejidos congelados fueron homogenizados con una solución desnaturalizante llamada “solución D” (el stock contiene 250 g de tiocianato de guanidina (Sigma) disueltos en 293 ml de agua bidestilada estéril tratada con dietilpirocarbonato (agua con DEPC autoclaveada), 17.6 ml de 0.075 M de citrato de sodio a pH 7 y 26.4 de sarcosil al 10% con agua tratada con DEPC, por cada 50 ml de esta solución en stock se adicionaba 350  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol

al momento de utilizarse). El volumen de solución D empleada dependía del tejido (Tabla 2). Las cantidades de acetato de sodio, fenol, cloroformo-isoamílico empleadas durante la extracción son referidas al volumen inicial de solución D en el que fue homogenizada la muestra. Al homogenado se le agregó un 1/10 del volumen de acetato de sodio 2 M, pH 4. Posteriormente se agregó un volumen de fenol frío saturado con agua y una quinta parte de volumen de cloroformo-isoamílico 49:1. Las muestras se dejaron reposar en hielo (4°C) durante 15 min. Posteriormente se centrifugaron a 9000 x g a 4°C durante 20 min. Se recuperó la fase acuosa y se le agregó un volumen de isopropanol y dejó toda la noche a –20°C.

Volumen en $\mu\text{l}$	PVN y Septum	Amígdala	Hipocampo, Corteza prefrontal y Tálamo
Solución de homogenización inicial (solución D)	150	350	500
Acetato de Sodio 2M, pH 4	15	35	50
Fenol	150	350	500
Cloroformo:isoamílico	30	70	100

Tabla 2. Cantidad de solución D, acetato de sodio, fenol y cloroformo:isoamílico utilizada en cada región.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 17000 x g a 4°C por 30 min. Se desechó del sobrenadante y el sedimento se resuspendió en solución D (1/3 del volumen inicial de homogenado); se agregó un volumen de isopropanol y se mantuvo a –20°C por una hora. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 17000 x g a 4°C por 30 min, se desechó el sobrenadante y el sedimento fue lavado con 250  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% y se centrifugó por 12 min en las mismas condiciones del paso anterior. El sobrenadante fue desechado de nuevo y el sedimento se resuspendió en agua tratada con DEPC. Se adicionó 1/10 de este volumen de resuspensión, de acetato de sodio 3 M, pH 5, 2 volúmenes de etanol absoluto y se guardaron a –20°C toda la noche.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 17000 x g a 4°C por 30 min. Se desechó el sobrenadante, se adicionaron 250  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% y fueron centrifugadas 12 min a la misma velocidad y temperatura. Se repitió el lavado. El exceso de etanol al 75% fue evaporado secando las muestras en el Savant durante 1-2 min. El sedimento final, que

contiene el RNA total, fue resuspendido en agua tratada con DEPC (150 µl para amígdala, hipocampo, corteza prefrontal y tálamo, 25 µl para el PVN y septum) y leída en un espectrofotómetro (Eppendorf BioPhotometer). La concentración de RNA se calculó diluyendo 2 µl de la muestra en 100 µl de agua y leyendo en un espectrofotómetro a 230, 260 y 280 nm. Sólo se utilizaron las muestras cuya relación 260/230 y 260/280 fuera mayor a 1.5. De estas muestras se hicieron alícuotas de 1 µg de RNA total en 12 µl para la reacción de RT-PCR y otras de 0.5 µg de RNA para analizar en un gel el estado del RNA (Figura 7).

La cantidad de RNA total contenida en cada muestra fue calculada usando la siguiente formula:  $\frac{40 * \text{factor de dilución} * \text{la densidad óptica a 260 nm}}{1000} = \mu\text{g RNA} / \mu\text{l}$

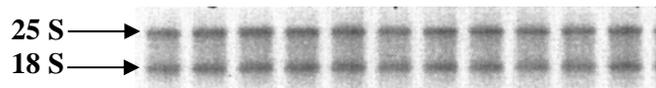


Figura 7. Se muestra el estado del RNA total extraído de una región representativa. En el gel de agarosa al 1% se puede ver bien definidas y separadas la fracción 25S y la 18S.

#### **V.8.- Cuantificación del RNAm por RT-PCR semicuantitativa.**

a) Obtención del DNAc por transcripción reversa (RT). Las alícuotas de 1 µg de RNA/12 µl fueron calentadas a 65°C por 5 min. Se les adicionó a cada muestra 20 µl de la mezcla de reacción para RT que contenía por tubo: 8.9 µl de agua tratada con DEPC, 6 µl de buffer RT (BRL) 5X, 3 µl DTT 0.1 M 10X, 0.5 µl de una mezcla previamente elaborada de deoxinucleotidos (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 10 mM, oligo dT 0.5 µg/ µl y 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa M-MVL RT 200U/ µl. Las reacciones de retrotranscripción se incubaron 2 hrs a 37°C. Posteriormente se guardaron a -20°C hasta el momento de amplificar.

b) PCR. Los RNA mensajeros de interés se amplificaron por PCR en reacciones separadas. Las secuencias de los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para cada RNAm, fueron previamente diseñadas en el laboratorio o tomadas de la literatura (de Gortari *et al.*, 2005; Aguilar Valles *et al.*, 2005). La expresión de ciclofilina (CYC) y gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) se utilizaron como control interno. Las condiciones de amplificación para cada uno de los RNA mensajeros fueron previamente optimizadas realizando cinéticas en las que se varió la cantidad de DNAc, la temperatura de hibridación (TM) y el número de ciclos (Figura 8). En todas las regiones, CYC y G3PDH fueron amplificadas con: 4  $\mu$ l DNAc y 50 pmol de oligos. Para los demás RNA mensajeros se emplearon 6  $\mu$ l de DNAc y 25 pmol de oligos.

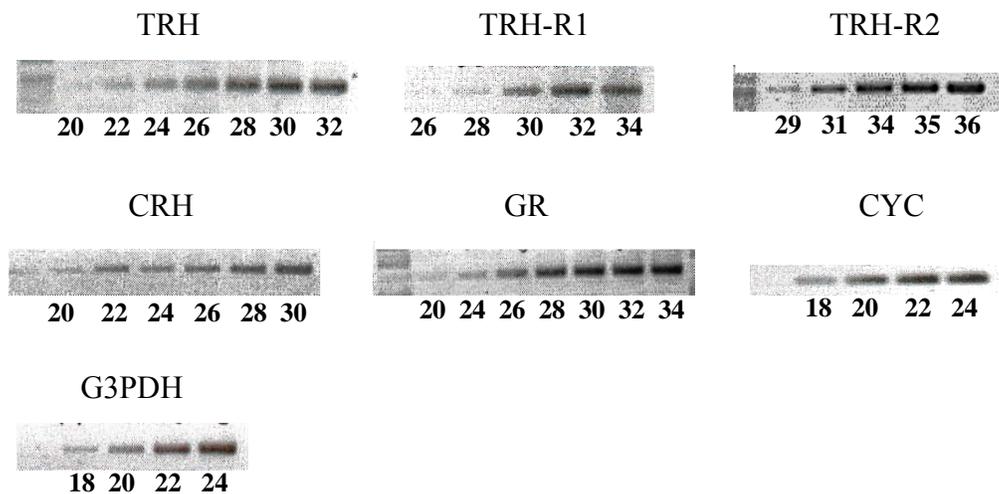


Figura 8. Representación de las cinéticas realizadas para el PVN optimizando el número de ciclos para cada RNAm de interés. Las cinéticas se realizaron utilizando para CYC y G3PDH: 4  $\mu$ l de DNAc y 50 pmol de oligonucleótido sentido y antisentido, y para todos los demás genes 6  $\mu$ l de DNAc y 25 pmol de cada oligo. En cada caso se muestra el número de ciclos. Para las demás región se realizaron cinéticas similares.

El número de ciclos usado para los RNA mensajeros de interés se muestra en la tabla 3. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 50  $\mu$ l que contenía: 33 o 35  $\mu$ l de agua tratada con DEPC, según se requirieran 6 o 4  $\mu$ l de DNAc respectivamente, 5  $\mu$ l de buffer amortiguador 10x, 2.5  $\mu$ l de cloruro de magnesio 30 mM, 1  $\mu$ l de dNTPs 10 mM, 1  $\mu$ l (equivalentes a 25 o 50 pmol) de oligos sentido y antisentido de interés y 0.5  $\mu$ l de enzima amplificasa DNA polimerasa termoestable (5U/ $\mu$ l).

	PVN	Amígdala	Corteza prefrontal	Tálamo	Séptum	Hipocampo	
						Ant.	Post.
pro-CRH	25	26	26	28	28	28	30
CRH-R1	29	29	30	31	32	31	31
GR	26	25			29	29	30
pro- TRH	22	28	29	25	29	27	29
TRH-R1	29	29	32	31	32	31	30
TRH-R2		32	29	26		33	32
PPII	29	29	29	29		28	29

Tabla 3. Número de ciclos de amplificación por PRC usados para cada gen y región.

La PCR fue realizada en un termociclador [Eppendorf Mastercycler Gradient] utilizando el siguiente programa: 1) 1 min a 94°C, 2) 1 min a la Tm específica al oligo, 3) 1.15 min a 72°C, 4) 15 min a 72°C como extensión final. Los pasos 1-3 se repitieron el número de ciclos necesario para cada RNAm.

#### V.9.- Análisis de la semi-cuantificación de los RNAm de interés.

Los productos del PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2%. En los cuales se cargó 10 µl del producto de PCR del gen de interés más 4 µl del producto de PCR del control interno: CYC o G3PDH. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y digitalizados en un analizador de imágenes [Biorad Multianalyst], que analiza las densidades de las bandas transformándolas en densidades ópticas. Las densidades ópticas de cada mensajero problema fueron divididas entre las densidades ópticas de los controles internos (CYC o G3PDH) (Figura 9).

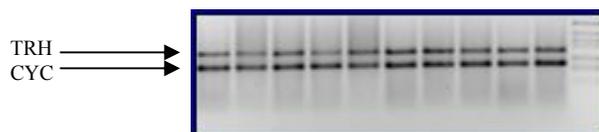


Figura 9. Imagen representativa de los productos finales de la PCR para TRH y CYC.

## VI.- Resultados

### VI.1.-Respuesta endócrina.

Como indicadores de la actividad del eje HHA en respuesta al estrés por RE se consideraron los siguientes parámetros: el nivel de expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en el PVN, el contenido de corticosterona en suero y el tamaño de la glándula adrenal (este último únicamente en la condición de RE crónica). Para el eje HHT se tomaron como parámetros los niveles del RNAm de pro-TRH, de TRH-R1 y TRH-R2 en el PVN; el contenido de TRH en el EM y los niveles séricos de TSH y hormonas tiroideas (T4 para el estrés agudo y T3 para el crónico). En ratas sometidas a RE aguda y sacrificadas 45 min después o sometidas a RE crónica y sacrificadas 45 min o 24 hrs después.

#### A) Actividad del eje HHA.

Estrés Agudo.

*Corticosterona.* Los animales fueron sometidos a restricción de movimiento (RE) una vez durante 30 min y sacrificados 45 min después. Consistente con lo reportado, observamos activación del eje HHA (Paskitti *et al.*, 2000), reflejado en incrementos en los niveles de CORT sérica. Se ha visto que los incrementos en CORT se presentan desde los 15 a los 60 min post-RE (Paskitti *et al.*, 2000). El análisis de varianza (ANOVA) de una vía demostró que en estas condiciones de estrés hubo un efecto significativo en el grupo sometido a RE ( $F_{2,41}=9.6$  y  $p=0.01$ ). La prueba post-hoc de Fisher reveló un incremento en la CORT sérica a 159% en el grupo RE comparado al control intacto (CI) tomado como el 100%. Los efectos fueron específicos para la condición de RE, pues el control asilado (CA) no tuvo cambios significativos en los niveles de CORT (Figura 10A).

*RNAm pro-CRH, CRH-R1 y GR.* Consistente con la respuesta en CORT, el análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y de GR en el PVN, demostró que los niveles de estos RNA mensajeros incrementaron significativamente por efecto de RE. La expresión del RNAm de pro-CRH incremento hasta 144.7%, el RNAm de CRH-R1 a 132% y el de GR a 177%, en relación al CI (100%). En el CA los niveles de estos tres RNA

mensajeros también incrementaron significativamente respecto al CI (Figura 10B). En conjunto estos resultados sugieren que el estrés por RE induce una rápida activación del eje HHA, y que el estrés ocasionado por aislar a las ratas (30 min) induce la expresión de los genes marcadores de estrés (CRH, CRH-R1 y GR), pero no es suficiente para incrementar los niveles de CORT sérica. El aislamiento es considerado un estrés psicológico que a largo plazo induce activación del eje HHA (Miachon *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1998; Parelló *et al.*, 2005).

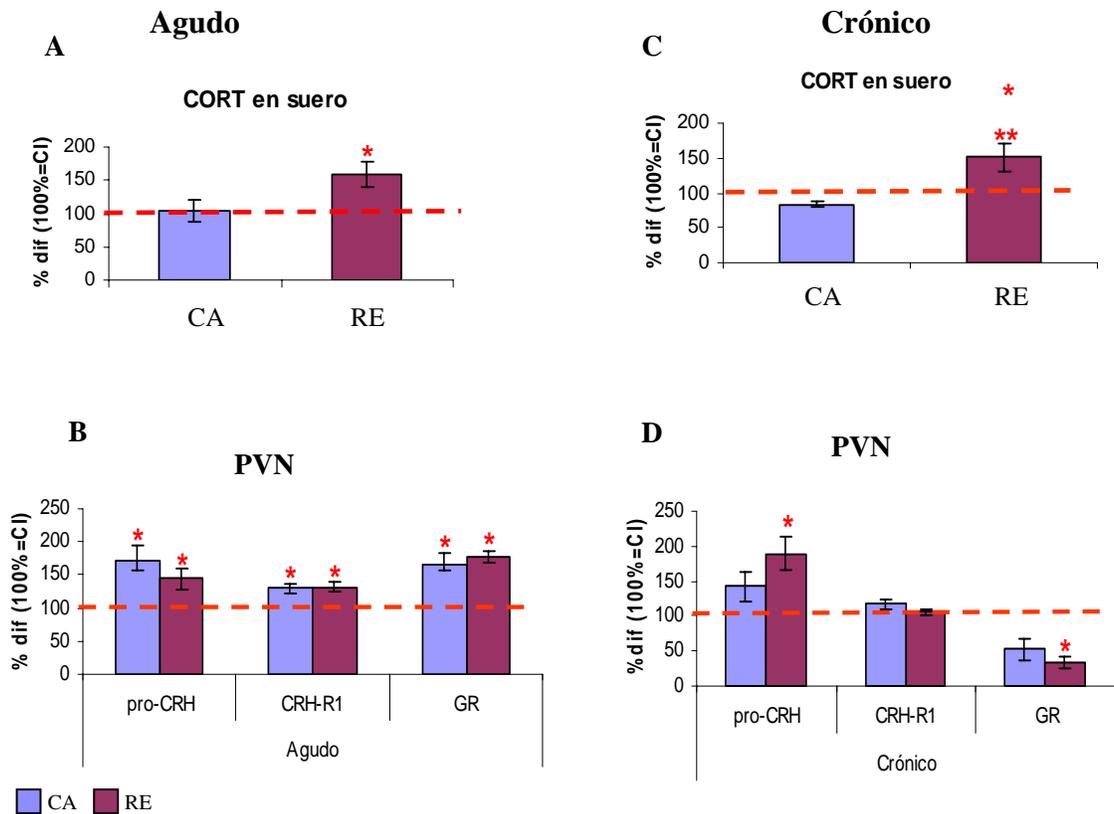


Figura 10. Efecto de RE aguda y crónica sobre la actividad del eje HHA. Los animales fueron sometidos a estrés agudo (1 día) o crónico (14 días) y sacrificados 45 min después. En A y B se muestran los efectos de RE aguda; en C y D de RE crónica. Los valores están presentados como la fracción porcentual del control intacto (CI, línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM. CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI, \*\* vs CA.  $p < 0.05$

### *Estrés crónico.*

Se decidió utilizar como estrés crónico 7 y 14 días de restricción de movimiento (RE), condiciones en las que se han mostrado los efectos sobre el eje HHA (Makino *et al.*, 2002); en el protocolo de 7 días de RE, los animales fueron sacrificados sólo a las 24 hrs post-RE. Además de los parámetros ya mencionados, en RE crónica se determinaron los efectos sobre el peso corporal, la ingesta de comida y la glándula adrenal.

*Peso e ingesta de comida.* Observamos una tendencia no significativa a reducir la tasa de ingesta y la ganancia de peso después de 7 y 14 días de RE ( $F_{2,219}=0.87$  y  $p=0.41$ ). Los efectos del estrés crónico sobre estas variables dependen de la duración, intensidad y tipo de estrés, así como de la cepa, del género y la edad (Roesch *et al.*, 1997; Dhabhar *et al.*, 1997). Nuestro paradigma no fue tan intenso para reproducir la disminución en la ingesta y el peso reportados para RE e IMO crónicos (Makino *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2004).

*Corticosterona.* No hubo respuesta de CORT en ninguno de los grupos sometidos a 7 días de RE (Tabla 4). En contraste, el ANOVA de una vía reveló que 14 días de RE tiene un efecto significativo ( $F_{4,46}=4.4$  y  $p=0.004$ ). La prueba post-hoc de Fisher demostró en el grupo RE aumentó hasta 151% a los 45 min (Figura 10C), persistente aun a las 24 hrs (Tabla 4). Consistente con estos resultados y como efecto acumulado de 14 días de restricción de movimiento, encontramos en el grupo RE, que la glándula adrenal había incrementado hasta 168% en comparación a CI (100%) y CA (Tabla 4).

*RNA<sub>m</sub> pro-CRH, CRH-R1 y GR.* Siete días de RE modificaron sólo los niveles del RNA<sub>m</sub> de CRH-R1, incrementando 2 veces ( $p<0.01$ ) en el grupo RE y casi una vez en el CA en comparación al CI (100%). Los niveles de este RNA<sub>m</sub> permanecieron elevados en los animales sometidos a 14 días de RE y sacrificados 24 hrs después, incrementando hasta 156% en el grupo RE en comparación a los dos grupos control (CI= 100%) (Tabla 4).

En contraste, a los 14 días de RE hubo efectos significativos sobre los niveles de los tres RNA mensajeros. El análisis semi-cuantitativo en el PVN, reveló que a los 45 min post-RE los niveles del RNA<sub>m</sub> de pro-CRH aumentó a 142% y disminuyeron los de GR a 53% respecto al CI (100%) (Figura 10D). Los efectos sobre la concentración del mensajero

de pro-CRH fueron transitorios ya que 24 hrs después de terminado el estrés había regresado a la concentración basal (Tabla 4). En cambio, los niveles del RNAm de GR permanecieron disminuidos en relación al CI y al CA.

A diferencia de lo ocurrido en la restricción aguda, los efectos de RE crónica antes mencionados son específicos de la restricción ya que el CA se comporta como el CI, sugiriendo habituación de la actividad del eje HHA inducido por el aislamiento crónico con la excepción del RNAm de CRH-R1 a los 7 días de RE (Tabla 4). En conjunto estos resultados confirman lo reportado en la literatura (Makino *et al.*, 1995; 1999 y 2002; Zelena *et al.*, 2003) y sugieren que RE crónica induce activación del eje HHA.

Efectos de RE crónica determinados 24 horas post-RE				
	7 días		14 días	
	CA	RE	CA	RE
<b>CORT</b>	112 ± 34	177 ± 24	95 ± 15	142 ± 14 **
<b>pro-CRH</b>	96 ± 8	88 ± 3	127 ± 9	112 ± 4
<b>CRH-R1</b>	183 ± 15*	312±28*	107±5	156 ±18**
<b>GR</b>	86 ± 6	89±7	99 ± 7	77 ± 5 **
<b>Adrenal</b>			106 ± 10	168 ± 8**

Tabla 4. Efecto de RE crónica durante 7 o 14 días, sobre la actividad del eje HHA: CORT sérica y expresión de pro-CRH, CRH-R1 y GR en el PVN. Las ratas fueron sacrificadas 24 hrs después de la última restricción. Los datos están presentados tomando como 100% al CI y representan la media ± ESM. CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \*\* vs CI y CA y \* vs CI. p<0.05.

## B) Actividad del eje HHT.

*RE aguda.* El ANOVA de una vía demostró efecto en el grupo RE sobre el contenido de TRH ( $F_{2,41}=9.6$  y  $p=0.0004$ ), sobre los niveles del RNAm de pro-TRH ( $F_{3,57}=10$  y  $p<0.0001$ ) y de TRH-R1 ( $F_{2,15}=11$  y  $p=0.001$ ). En el grupo sometido a RE el contenido de TRH en la eminencia media (EM) incrementó hasta 150% en relación a los dos controles (CI=100%). En el PVN la cantidad del RNAm de pro-TRH disminuyó a 75%, mientras que la concentración del RNAm de TRH-R1 aumentó hasta 179% en relación al CI (100%). Los niveles del RNAm de TRH-R1 también aumentaron significativamente en el CA (Figura 11A).

A diferencia de la fuerte disminución en los niveles de TSH sérica observada a los 15 min, a los 45 min regresaron a los niveles basales. A este tiempo tampoco hubo efectos sobre los niveles de T4 en suero (Figura 11B).

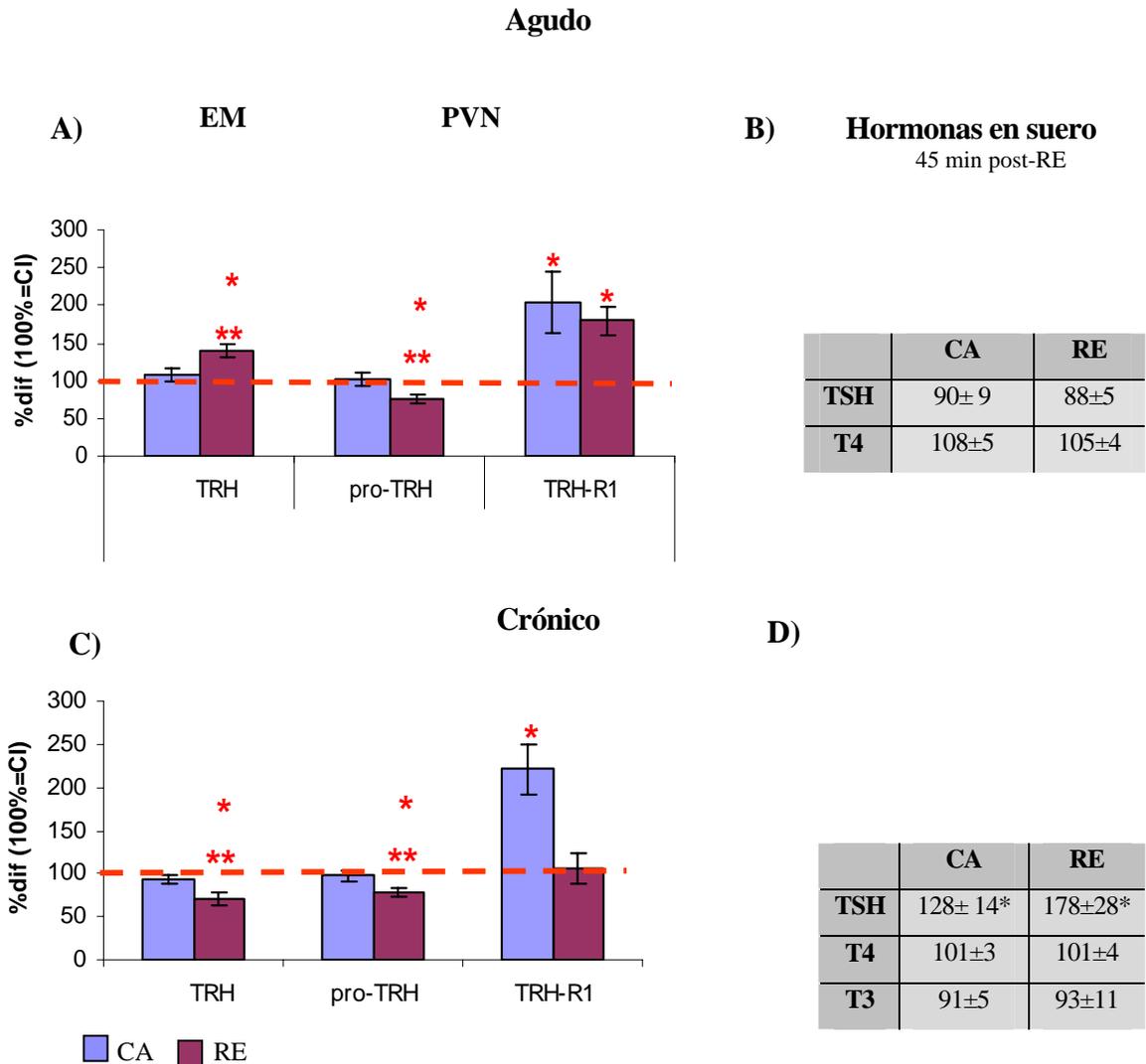


Figura 11. Contenido de TRH en la EM y análisis semi-cuantitativo del RNAm de pro-TRH y TRH-R1 en el PVN (izquierda) y niveles de TSH, T4 y T3 en suero (derecha) de ratas sometidas a RE aguda (panel A y B) o crónica 14 días (panel C y D) y sacrificadas 45 min después de la última RE. Todos los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media ± ESM. CI: control intacto; CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI; \*\* vs CI y CA. p<0.05

En conjunto los datos sugieren que la actividad del eje HHT es modulada de manera rápida (desde los 15 min) y transitoria (a los 45 min los efectos desaparecen o son de menor magnitud).

Comprobando el efecto negativo ya reportado de RE aguda sobre el eje HHT y, que los efectos son de mayor magnitud a los 15 min que los observados a los 45 min post-RE.

*RE crónica.* La restricción crónica afecta la actividad del eje HHA (Makino *et al.*, 2002; Paskitti *et al.*, 2000), sin embargo, poco se sabe de sus efectos sobre la actividad del eje HHT y sobre el metabolismo del sistema TRHérgico en el sistema límbico. No se observaron efectos en la actividad del eje HHT en animales sacrificados 24 hrs después de 7 (los datos no se muestran) o 14 días de RE (Tabla 5). Pero sí hubo cambios en los animales sacrificados 45 min después de 14 días de RE. El contenido de TRH en la EM disminuyó a 69% respecto al CI (100%) y a 76% respecto al CA; la expresión del RNAm de pro-TRH el PVN disminuyó a 78% en comparación a los grupos control; mientras que la expresión del RNAm de TRH-R1 en el grupo sometido a RE no se modificó, pero sí en el CA (Figura 11C). Los niveles séricos de TSH en el grupo RE incrementaron hasta 178% en relación al CI (100%) y a 150% respecto al CA ( $F_{2,14}=21$  y  $p<0.0001$ ) (Figura 11D). No hubo diferencia en los niveles de T4 y T3.

<b>Actividad del eje HHT determinada 24 horas post-RE</b>				
	<b>TRH</b>	<b>pro-TRH</b>	<b>TSH sérica</b>	<b>T3 sérica</b>
<b>CA</b>	126 ± 7	97 ± 10	108±6	100 ± 6
<b>RE</b>	93 ± 4	98 ± 7	112 ± 14	107 ± 7

Tabla 5. Se muestra el contenido de TRH en la EM, los niveles del RNAm de pro-TRH en el PVN y los niveles séricos de TSH y T3 de ratas sometidas a 14 días de RE y sacrificadas 24 hrs después. Los datos son presentados tomando como 100% al control intacto y representan la media ± ESM. CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción.

## **VI.2.- Respuesta al estrés en otras regiones del sistema límbico: RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR.**

### *A) Amígdala.*

*RE aguda.* De acuerdo a lo reportado anteriormente (Hsu *et al.*, 1998; Makino *et al.*, 1999), el RNAm de pro-CRH aumentó hasta 138%, en la amígdala ( $F_{3,38}=4.6$  y  $p=0.008$ ) sin afectar la expresión de CRH-R1 si bien, aumentaron significativamente en el CA. En

cambio, la concentración del RNAm de GR disminuyó a 54% en relación a los dos grupos control (Figura 12A).

*RE crónica.* No hubo cambio en los niveles de expresión del RNAm de pro-CRH en los animales sacrificados 45 min después de 14 días de RE y sólo a las 24 hrs hubo un incremento pequeño pero significativo ( $F_{2,29}=10.5$  y  $p=0.0004$ ) (Tabla 6).

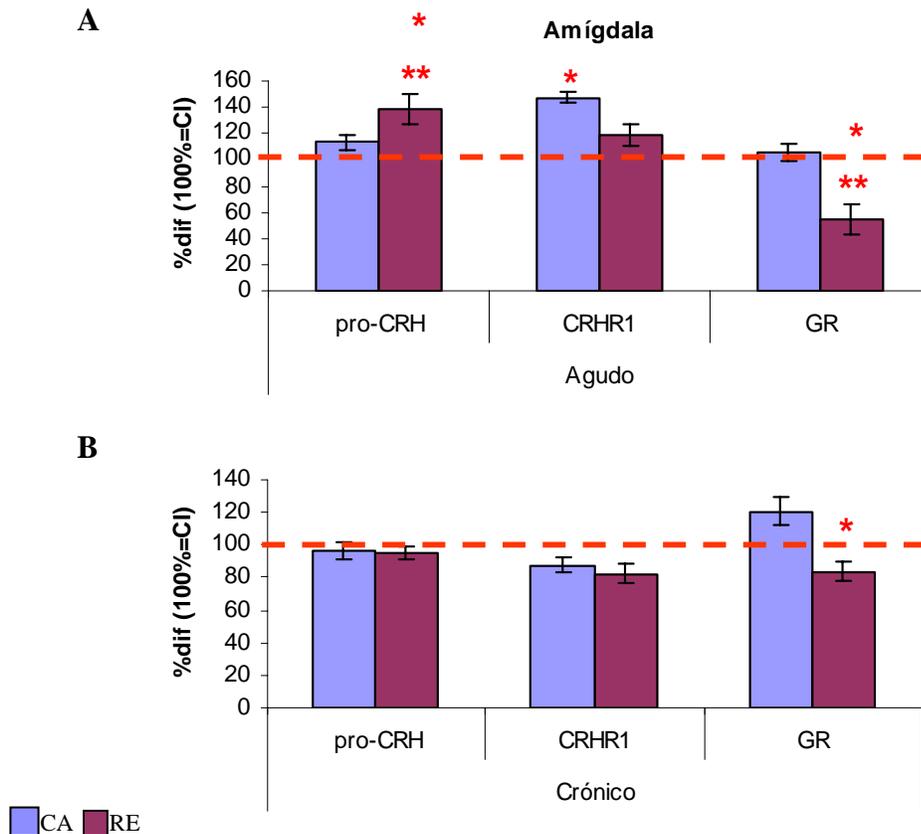


Figura 12. Expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la amígdala de ratas sometidas a RE aguda (panel A) y crónica (panel B) y sacrificadas 45 min después del último episodio. Los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM. CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI; \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

Efecto de RE crónico en la expresión del RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la amígdala				
	7 días		14 días	
	CA	RE	CA	RE
<b>pro-CRH</b>	98 ± 8	94 ± 4	111 ± 2	121 ± 4**
<b>CRH-R1</b>	97 ± 5	102 ± 6	92 ± 6	89 ± 6
<b>GR</b>	84 ± 6*	75 ± 5*	70 ± 4*	75 ± 4 *

Tabla 6. Expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la amígdala de ratas sometidas a RE crónica y sacrificadas 24 hrs post-RE. Los valores están presentados como la fracción porcentual del CI, y representan la media ± ESM. CA: control aislado, RE: grupo experimental. \* vs CI, \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

Similar a lo observado para el RNAm de pro-CRH, los animales sometidos a 14 días de RE y sacrificados 45 min después, no presentaron cambios significativos en los niveles del RNAm de CRH-R1 ( $F_{2,33}=2.6$  y  $p=0.8$ ), si bien se observa una tendencia a la disminución (Figura 12B), que desapareció a las 24 hrs post-RE (Tabla 6). En contraste los niveles del RNAm de GR disminuyeron en los animales sometidos a RE por 7 días ( $F_{2,16}=6$  y  $p=0.009$ ) o 14 días sacrificados a las 24 hrs ( $F_{2,30}=15$  y  $p<0.001$ ) y, aunque en menor grado, (16%) en los animales sacrificados a los 45 min post-RE. La inhibición de la expresión en GR también se observó en el CA a los 7 y 14 días de estrés (Tabla 6).

#### B) Corteza prefrontal.

En esta región los efectos fueron determinados sólo a los 45 min post-RE. El mensajero de pro-CRH no respondió a la condición aguda (los datos no se muestran), pero sí a la crónica ( $F_{2,15}=5$  y  $p=0.02$ ), disminuyendo en el grupo RE y en el CA en la misma proporción respecto al CI. Por otra parte, los niveles de expresión del RNAm de CRH-R1 se modificaron de manera específica en RE aguda ( $F_{2,30}=6$  y  $p=0.005$ ) y crónica ( $F_{2,16}=13$  y  $p=0.0004$ ). En ambos casos, los niveles de este RNAm disminuyeron en el grupo RE respecto a los dos grupos control (Figura 13). Para esta región no se determinó el efecto del estrés por RE sobre el RNAm de GR.

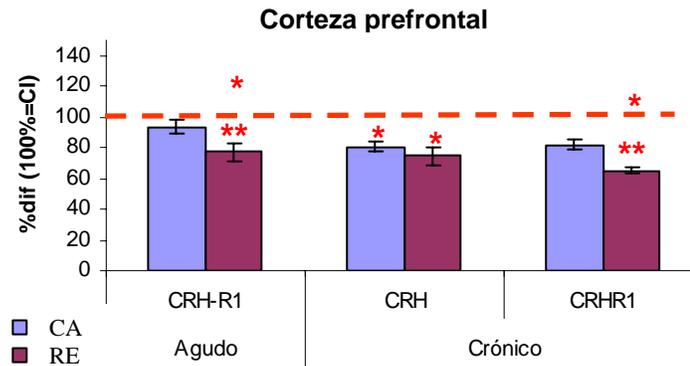


Figura 13. Niveles de expresión de los RNAm de pro-CRH y CRH-R1, en la corteza prefrontal de ratas sometidas a RE aguda o crónica por 14 días y sacrificadas 45 min después. Los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM. CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI; \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

### C) Hipocampo.

Las determinaciones de los niveles de RNAm en el hipocampo anterior o posterior sólo se hicieron en la condición crónica a los 7 días donde no se observaron y, a los 14 días de RE.

*Hipocampo anterior.* Los niveles del RNAm de pro-CRH incrementaron ( $F_{2,13}=5$  y  $p=0.023$ ) en CA y RE a los 45 min. El efecto fue mayor 24 hrs después ( $F_{2,12}=12$  y  $p=0.0013$ ) (Figura 14A). El RNAm de CRH-R1 disminuyó en el grupo RE ( $F_{2,13}=6$  y  $p=0.013$ ) comparado a los dos grupos control a los 45 min, regresando a niveles basales a las 24 hrs (Figura 14A).

*Hipocampo posterior.* En esta región los niveles del RNAm de pro-CRH no cambiaron (los datos no se muestran), pero sí los de CRH-R1 ( $F_{2,15}=9$  y  $p=0.003$ ), incrementando en el grupo RE a 120% comparado con el CI (100%) y a 140% respecto al CA a los 45 min post-RE, normalizándose a las 24 hrs (Figura 14B).

*RNAm de GR.* El hipocampo es una región del sistema límbico muy sensible a los efectos del estrés crónico, el RNAm de GR muestra una regulación negativa por altos niveles de GC circulantes, inducidos por situaciones de estrés crónico como IMO (Karandrea *et al.*, 2002) y RE (Paskitti *et al.*, 2000). En nuestras condiciones de estrés crónico no hubo una

respuesta contundente del RNAm de GR, los niveles de este mensajero no cambiaron en los animales sometidos por 7 días a RE en la parte anterior ni en la posterior del hipocampo (no se muestran los datos). A los 14 días, 45 min después, se observó una tendencia inhibitoria que debido a la alta desviación de los datos, no fue significativa. Por el contrario, a las 24 hrs los niveles de RNAm de GR en el grupo RE fueron indetectables, sugiriendo un efecto inhibitorio de RE crónica sobre la expresión del RNAm de GR en la parte anterior hipocampal (Figura 14A).

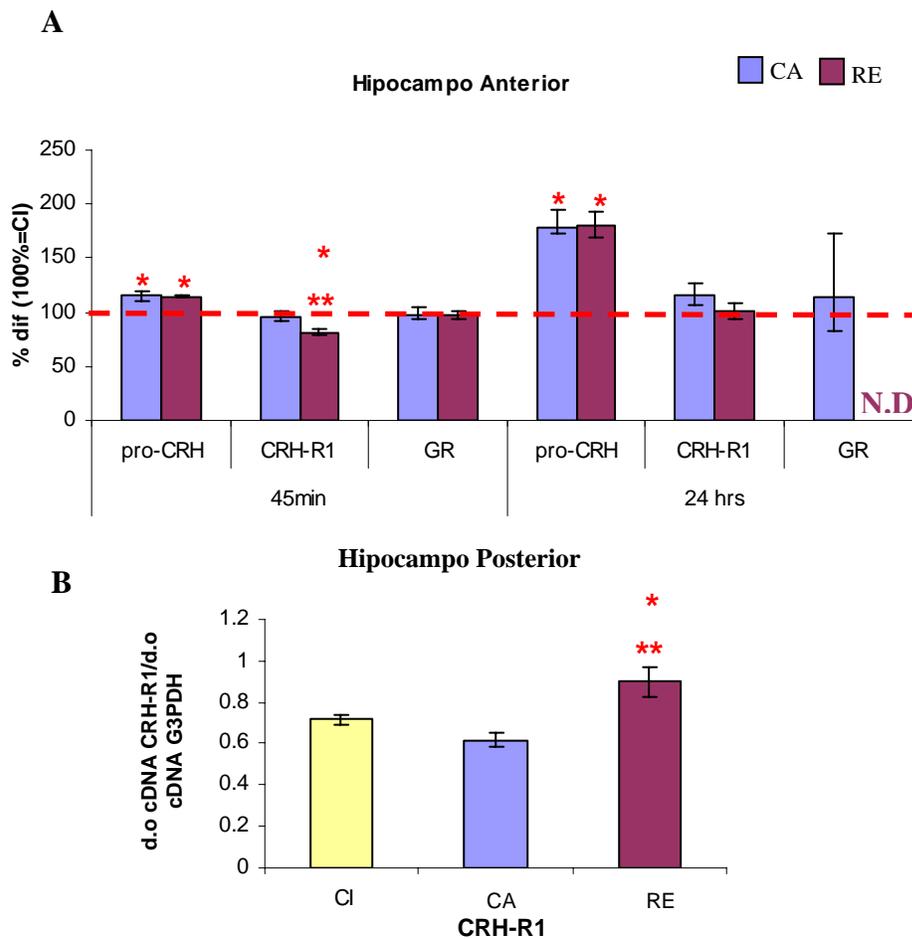


Figura 14. Niveles de expresión de los RNAm de pro-CRH, CRH-R1 y GR en la región anterior (panel A) y posterior (panel B, a los 45 min) del hipocampo. Las ratas fueron sometidas a RE durante 14 días y sacrificadas 45 min o 24 hrs después de la última restricción. Los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM; en el panel B son presentados en unidades arbitrarias de la relación de la densidad óptica del DNAc de CRH-R1 y G3PDH. CI: control intacto; CA: control aislado, RE: grupo sometido a RE. \* vs CI; \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

*D) Septum.* A los 7 días de RE no hubo cambios en la expresión del RNAm de pro-CRH; la de CRH-R1 disminuyó a 69% en RE contra el CI (100%), en el CA mostró una tendencia a disminuir (a 76%,  $p=0.07$  vs CI). A los 14 días hubo una tendencia a incrementar la expresión de CRH-R1 en RE hasta 184% respecto al CI (100%). La concentración del RNAm de GR disminuyó a 68% en RE ( $F_{2,16}=6.6$  y  $p=0.008$ ) respecto al CI (100%) a los 7 días; mientras que a los 14 días, sólo disminuyó a 88% ( $F_{2,16}=4$  y  $p=0.035$ ). En el CA también disminuyeron significativamente los niveles del RNAm de GR.

*E) Tálamo.* No se presentaron cambios en el nivel del RNAm de pro-CRH ni de CRH-R1, en los animales sometidos a 14 días de RE (los datos no se muestran). Los efectos sobre el RNAm de GR no fueron determinados.

### **VI.3.- Cambios en los elementos de la transmisión TRHérgica en el Sistema Límbico.**

#### *A) Amígdala.*

*RE aguda.* La restricción aguda no tuvo efecto sobre la expresión del RNAm de pro-TRH, ni de TRH-R1 o TRH-R2, pero sí en el contenido de TRH ( $F_{3,48}=6$  y  $p=0.0015$ ) de las ratas sometidas a RE (incrementó hasta 156% respecto al CI y a 137% respecto al CA). La expresión de la PPII disminuyó sólo en comparación a la del CI (Figura 15A).

*RE crónica.* En los animales sometidos a 14 días de RE y sacrificados 45 min después incrementó el contenido de TRH hasta 179% ( $F_{2,15}=21$  y  $p<0.0001$ ) respecto al CI (100%) y a 157% en relación al CA. El efecto en RE se mantuvo 24 hrs incrementando hasta 159% respecto a los dos grupos control (Tabla 7). En RE los niveles del RNAm de pro-TRH disminuyeron a 86% respecto al CI y al CA (Figura 15B), y a las 24 hrs regresaron a los niveles basales (Tabla 7). No se modificaron ni la expresión del RNAm de TRH-R1 o TRH-R2 ni de la PPII en ninguno de los tiempos medidos (Tabla 7).

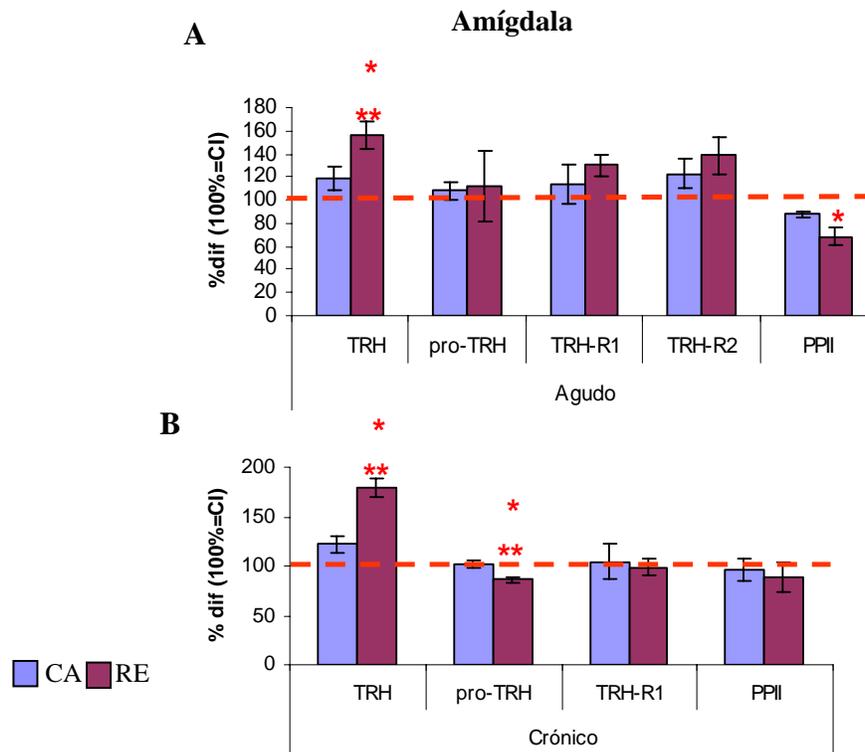


Figura 15. Contenido de TRH y análisis semi-cuantitativo de los RNAm de pro-TRH, sus receptores R1 y R2 y la PPII en la amígdala de ratas sometidas a RE aguda (panel A) o crónica durante 14 días (panel B) y sacrificadas 45 min después. Los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM. CI: control intacto, CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI; \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

Elementos de la vía TRHérgica en la amígdala			
	CI	CA	RE
TRH	100 $\pm$ 4	100 $\pm$ 6	159 $\pm$ 8 **
pro-TRH	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 8	99 $\pm$ 6
TRH-R1	100 $\pm$ 20	96 $\pm$ 12	97 $\pm$ 13
TRH-R2	100 $\pm$ 37	91 $\pm$ 30	115 $\pm$ 40
PPII	100 $\pm$ 7	102 $\pm$ 12	101 $\pm$ 11

Tabla 7. Cambios encontrados en los elementos de la transmisión TRHérgica en la amígdala por 14 días de RE a las 24 hrs post-RE. Los valores están presentados como la fracción porcentual del CI y representan la media  $\pm$  ESM. CI: control intacto, CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \*\* vs CI y CA.  $p = 0.0002$

*B) Corteza prefrontal.*

*RE aguda.* En el grupo sometido a RE los niveles del RNAm de pro-TRH disminuyeron a 68% (respecto al CI=100%), y los niveles del RNAm de TRH-R1 disminuyeron a 45%, mientras que los del RNAm de TRH-R2 no cambiaron (Figura 16A). El ANOVA mostró un efecto positivo de RE sobre el contenido del péptido ( $F_{3,61}=3$  y  $p=0.03$ ), incrementando

hasta 143% y en el CA respecto al CI (100%) (Figura 16A). Bajo estas condiciones los niveles de expresión del RNAm de la PPII no se modificaron (no se muestran los datos).

*RE crónica.* Para la corteza prefrontal los efectos de RE crónica (durante 14 días) sólo se determinaron a los 45 min. La cantidad del RNAm de pro-TRH aumentó hasta 166% en RE respecto al CI (100%) mientras que los niveles del RNAm de TRH-R2 incrementaron 3.5 veces (en relación al CI=100%) y, 2.8 veces en el CA respecto al CI (100%). No se presentaron cambios en el contenido de TRH ni en la expresión del RNAm de TRH-R1 (Figura 16B), tampoco de la PPII (el dato no se muestra).

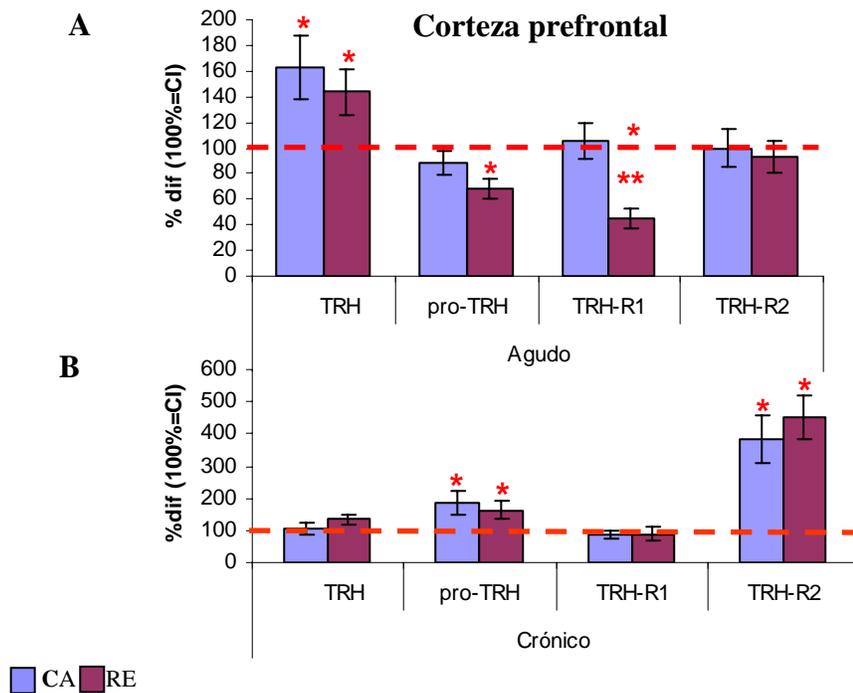


Figura 16. Contenido de TRH y análisis semi-cuantitativo de los RNAm de pro-TRH, TRH-R1 y TRH-R2 en la corteza prefrontal de ratas sometidas a RE aguda (panel A) o crónica durante 14 días (panel B) y sacrificadas 45 min después. Los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM. CI: control intacto, CA: control asilado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI; \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

C) *Tálamo*. En esta región sólo se analizó el efecto de 14 días de RE sobre los niveles de expresión de los RNAm de la transmisión TRHérgica. A los 45 min post-RE el contenido de TRH disminuyó a 67% en RE respecto a los dos grupos control. El efecto se mantuvo y a las 24 hrs disminuyó a 61% en relación al CI (100%), en el CA también disminuyó el contenido del péptido (Figura 17A). Los niveles de expresión del RNAm de pro-TRH disminuyeron en RE respecto al CI y al CA, a los 45 min post-RE, así como los niveles del RNAm de TRH-R2 ( $p=0.003$  vs CI), regresando los dos a niveles basales a las 24 hrs (Figura 17B). Los niveles del RNAm de TRH-R1 incrementaron 1.3 veces en RE desde los 45 min (en relación a los dos grupos control) y continuaron elevados 24 hrs después, tiempo al cual el efecto fue específico a la condición de RE. De manera similar la expresión de la PPII incrementó en RE (vs CI=100%).

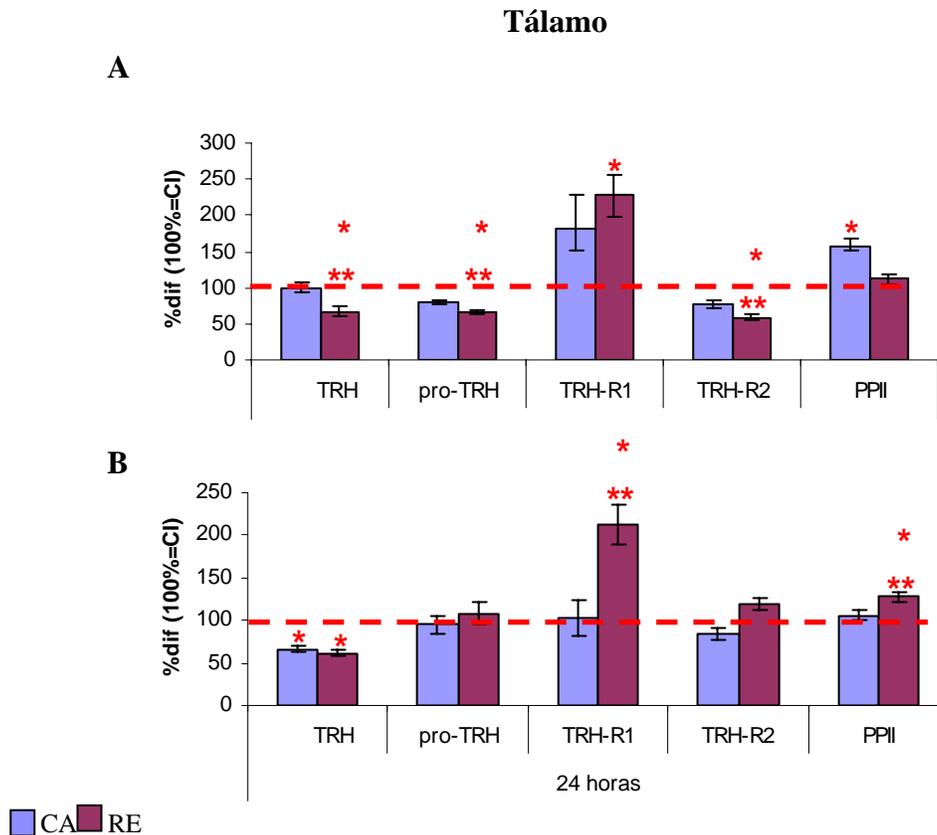


Figura 17. Contenido de TRH y análisis semi-cuantitativo de los RNAm de pro-TRH, sus receptores TRH-R1 y TRH-R2 en el tálamo de ratas sometidas a RE crónica durante 14 días y sacrificadas 45 min (A) o 24 hrs (B) después. Los datos son presentados tomando como 100% al CI (línea punteada) y representan la media  $\pm$  ESM. CI: control intacto, CA: control aislado, RE: grupo sometido a restricción. \* vs CI; \*\* vs CI y CA.  $p < 0.05$

D) *Septum*. Esta fue la única región donde se observaron efectos específicos y significativos en el contenido de TRH. A los 7 días de RE, disminuyó el contenido del péptido en RE respecto a los dos grupos control, mientras que a los 14 días no hubo cambios. Tampoco hubo efectos sobre los niveles de expresión de todos los RNAm analizados a los 7 o 14 días de RE (los datos no se muestran).

E) *Hipocampo anterior y posterior*. En esta región los elementos de la transmisión TRHérgica no variaron por efecto de las condiciones de estrés aquí usadas (los datos no se muestran).

En la tabla 8 se resumen los resultados obtenidos por efecto del estrés agudo y crónico.

	PVN			Amígdala			Corteza pref.		Tálamo	
	Agu.	Cron.		Agu.	Cron.		Agu.	Cron.	Cron.	
		45	24		45	24		45	45	24
<b>pro-CRH</b>	↑	↑	=	↑*	=	↑*	=	↓	=	=
<b>CRH-R1</b>	↑	=	↑*	=	=	=	↓*	↓*	=	=
<b>GR</b>	↑	↓	↓*	↓*	↓	↓	n.a	n.a	n.a	n.a
<b>TRH</b>	↑*	↓*	=	↑*	↑*	↑*	↑	=	↓*	↓
<b>pro-TRH</b>	↓*	↓*	=	=	↓*	=	↓	↑	↓*	=
<b>TRH-R1</b>	↑	=	n.a	=	=	=	↓*	=	↑	↑*
<b>TRH-R2</b>	n.a	n.a	n.a	=	=	=	=	↑	↓*	=
<b>PPII</b>	n.a	n.a	n.a	↓	=	=	=	=	=	↑*

**Hormonas en suero y glándula adrenal**

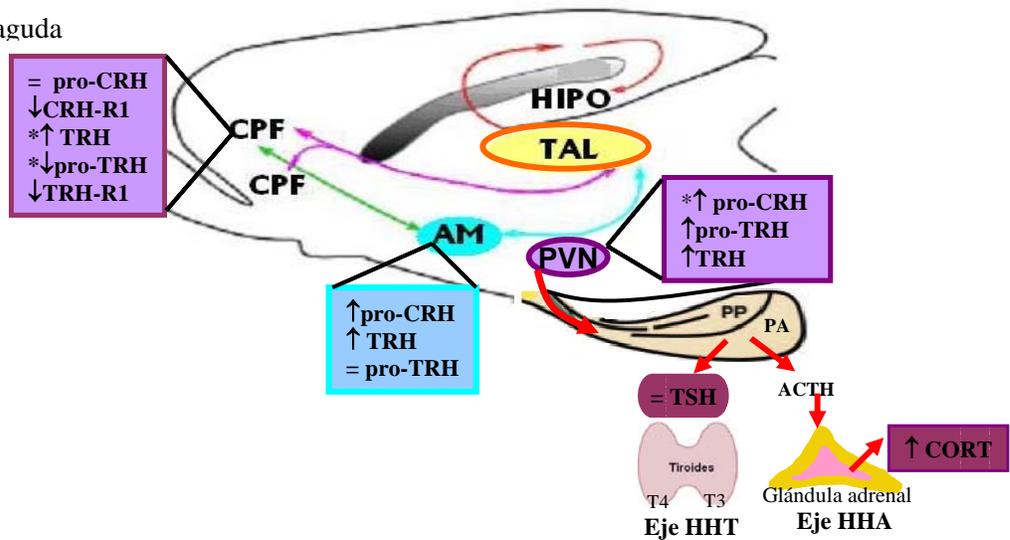
	CORT		TSH		T3	T4	Adrenal
	45	24	45	24	45	24	24
<b>Agu.</b>	↑		=		n.a	=	n.a
<b>Cron.</b>	↑*	↑*	↑*	=	=	=	↑*

Tabla 8. Se muestran los resultados obtenidos en el sistema límbico por efecto de la restricción de movimiento (RE) aguda o crónica y los niveles de hormonas en suero. ↑: incremento; ↓: disminución; = sin cambio; n.a: no analizado; 45 min post-RE, 24 hrs post-RE. En negro se muestran los efectos inespecíficos, y con asterisco (\*) los cambios específicos a RE.

## VII.- Discusión

El objetivo de este trabajo fue determinar si las neuronas TRHérgicas del sistema límbico están involucradas en la respuesta al estrés psicológico usando el modelo de RE en condiciones agudas y crónicas. Para cumplir con el objetivo buscamos cambios en la expresión de los elementos de la actividad TRHérgica: pro-TRH, sus receptores TRH-R1 y TRH-R2, y la PPII, así como en el contenido de TRH. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos, y que a continuación trataremos de darles una interpretación.

A) RE aguda



B) RE crónica

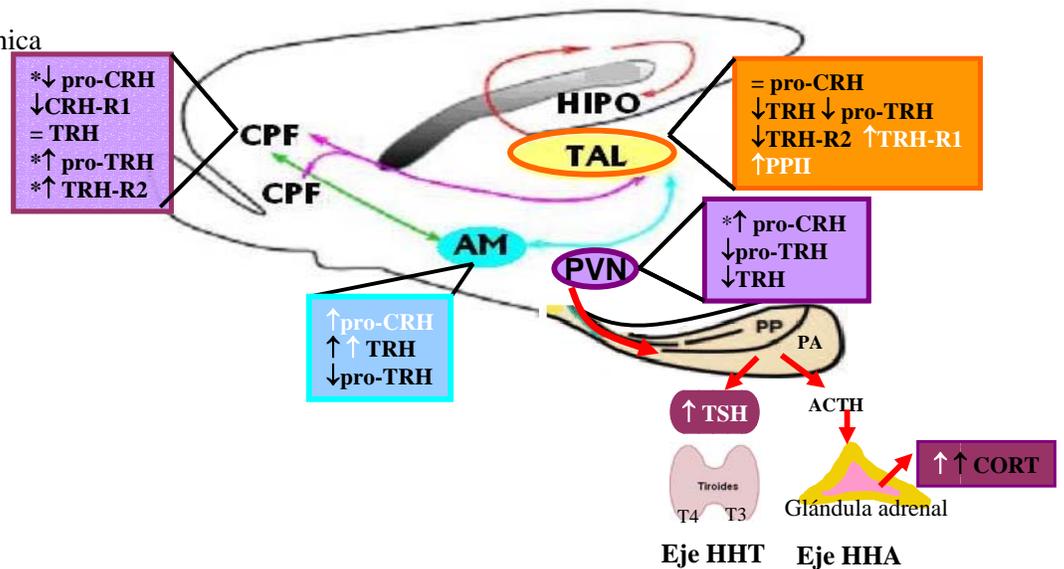


Figura 18. Cambios observados en el sistema límbico y en los ejes neuroendócrinos, por efecto de RE aguda (A) y crónica (B). PVN: núcleo paraventricular hipotalámico. AM: amígdala. TAL: tálamo. CPF: corteza prefrontal. HIPO: hipocampo. PP: lóbulo posterior de la hipófisis. PA: adenohipófisis. ACTH: corticotropina. CORT: corticosterona. TSH: tirotropina. ↑: incrementa. ↓: disminuye. = sin cambio. \*cambios inespecíficos. Dentro de los recuadros: en negro se presentan los cambios a los 45 min post-RE, y en blanco los cambios a las 24 hrs post-RE.

### VII.1.- Respuesta endócrina.

Se analizó la actividad del eje HHA tomando como indicadores los niveles de CORT en suero y la expresión de los genes del estrés: CRH, CRH-R1 y GR en el PVN, para asegurar que las condiciones de RE utilizadas en este trabajo representara una situación de estrés, como se ha reportado anteriormente. El análisis de la expresión del RNAm es un indicador de actividad neuronal, puesto que condiciones (*in vitro* o por la administración i.c.v del péptido) que estimulan la liberación del péptido simultáneamente inducen incremento en la expresión del RNAm de su precursor (Heinrichs *et al.*, 2004; Cote-Vélez *et al.*, 2005).

La RE aguda indujo la activación del eje HHA: incrementaron los niveles de CORT en suero, en concordancia con lo ya reportado (Viau *et al.*, 2002; Paskitti *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2000); también se aumento la expresión de pro-CRH (Hsu *et al.*, 1998) y de CRH-R1 (Imaky *et al.*, 1996; Makino *et al.*, 1999) en el PVN (Turnbull y Rivier 1997). Sin embargo, contrario a lo reportado, la expresión de GR incrementó (Paskitti *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2000); la expresión de este gen disminuye por efecto de estresores más severos como IMO (Makino *et al.*, 1999) y probablemente refleje alguna alteración en la retroalimentación negativa de los GC sobre la actividad del eje HHA.

La exposición crónica a RE también activó al eje HHA sin causar habituación como en algunos casos se ha reportado por efecto de la exposición repetida al mismo estresor (homotípico) (Aguilera, 1994; Ma *et al.*, 1997). Se considera que hay habituación cuando disminuye la respuesta de ACTH, CORT y de la expresión del RNA heteronuclear y mensajero de CRH en el PVN (Ma y Lightman, 1998). De manera contraria en RE crónica los niveles de CORT sérica incrementaron rápidamente y el efecto se mantuvo hasta las 24 hrs de terminado el estímulo. Aunque el incremento fue ligeramente menor (un 10% menor) al observado a los 45 min, lo que pudiera interpretarse como habituación. Sin

embargo, los cambios observados en la expresión de CRH-R1 y GR en el PVN, más la hipertrofia de la glándula adrenal apoyan la hipótesis de activación persistente del eje HHA y no de una habituación.

Por un lado, se ha reportado que el incremento en la expresión de CRH-R1 contribuye a la secreción sostenida de ACTH en condiciones de estrés crónico, pero no actuando sobre la expresión del mensajero de CRH sino probablemente sobre el de vasopresina (Dal-Zotto *et al.*, 2002). Se considera que en estrés crónico es la vasopresina y no el CRH, el efector importante para mediar la actividad del eje HHA (Ma *et al.*, 1999; Dal-Zotto *et al.*, 2002). Aunque en este trabajo no analizamos los efectos sobre ACTH ni de vasopresina, hay reportes de que RE crónica incrementa el contenido de vasopresina en la EM y los niveles del RNAm de su precursor en el PVN, sin afectar la expresión de pro-CRH. El estrés crónico atenúa la retroalimentación negativa mediada por GC, a través de la disminución de GR (proteína y RNAm) en sitios de control del eje HHA (Aguilera *et al.*, 1994; Herman *et al.*, 1995). La disminución en la expresión de GR en el PVN observada en estas condiciones, apoya la atenuación de la retroalimentación negativa mediada a nivel del PVN.

Un estímulo estresante puede causar habituación dependiendo de su intensidad, periodicidad y duración (Dhabhar *et al.*, 1997). Una sola exposición a IMO induce habituación, cuando el mismo estímulo estresante es aplicado días o semanas después (Dal-Zotto *et al.*, 2002; Valléz *et al.*, 2003), mientras que la exposición repetida a RE (18 o 21 días) que es menos intensa no causa habituación, aunque en algunos casos puede ocasionar adaptación en la secreción de ACTH pero no de CORT (Popovic, 1988; Pitman *et al.*, 1988). En las condiciones usadas en este trabajo RE crónica no fue un estrés fuerte para inducir habituación ni para reducir la ingesta y el peso como lo reportado para IMO crónica (Makino *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2004).

## **VII.2.- Actividad del eje HHT y de las neuronas TRHérgicas del PVN.**

Varios reportes establecen que la actividad del eje HHT es modulada rápida y transitoriamente por estrés por frío o el ayuno (Uribe *et al.*, 1993; Van Haasteren *et al.*, 1995; Fukuhara *et al.*, 1996; de Gortari *et al.*, 2000). Sin embargo, poco se sabe sobre la

regulación del eje HHT durante situaciones de estrés psicológico. Se ha visto que RE no representa retos metabólicos para el organismo, por lo que nos permite analizar el papel del TRH en las respuestas al estrés fuera de su papel como regulador metabólico. En este trabajo demostramos que la restricción aguda modifica la actividad de las neuronas TRHérgicas en el PVN sin afectar la secreción de TSH ni de T4 en suero (a los 45 min post-RE).

La RE aguda reprodujo algunos de los efectos reportados para IMO (Cizza *et al.*, 1996): aumentó el contenido de TRH en la eminencia media (EM) (reflejo de una liberación disminuida) y bajaron los niveles del RNAm de pro-TRH en el PVN lo que sugiere una inhibición de las neuronas TRHérgicas, aunque de menor magnitud a la observada 15 min post-RE (Rebollado, 2006). Contrario a lo reportado, no encontramos cambios en los niveles de TSH. Sin embargo, cuando los efectos de RE aguda sobre esta hormona se miden a los 15 min post-RE, los niveles de TSH son casi la mitad de los basales (Rebollado, 2006). Los efectos sobre la secreción de TSH parecen depender de la intensidad del estrés y del tiempo del estímulo. El estrés por ruido y la IMO aguda (durante 5-15 min) incrementan los niveles de TSH (Langer *et al.*, 1983) mientras que IMO aguda por 2 hrs la disminuyen (Cizza *et al.*, 1996).

La inhibición de la secreción de TSH a estos tiempos cortos no repercute en modificar los niveles de hormonas tiroideas si bien, incrementos rápidos y transitorios en los niveles de T4 y T3 en suero han sido reportados por efecto de 2 min de IMO (Tarakulov *et al.*, 1994) mientras que, periodos más largos (2 hrs) de este estresor (Cizza *et al.*, 1996), así como situaciones de estrés crónico (14 días) ocasionado por un choque eléctrico en las extremidades del animal (Helmreich *et al.*, 2005) disminuyen los niveles de estas hormonas. La IMO y el estrés ocasionado por el choque eléctrico (en la extremidad del animal), tienen componentes tanto psicológicos como físicos lo cual dificulta entender si la modulación de las hormonas tiroideas depende sólo del elemento físico del estrés o, de la intensidad del estrés psicológico. La inhibición del eje HHT puede repercutir en un ahorro energético que permite al organismo contender con situaciones amenazantes, sin embargo, nuestros resultados confirman lo reportado en cuanto al estrés psicológico causado por RE,

que no representa retos metabólicos para el organismo, asegurando una tasa metabólica adecuada.

La RE crónica también modificó la actividad de las neuronas TRHérgicas y los niveles de TSH sérica: disminuyó la expresión del RNAm de pro-TRH en el PVN y su contenido en la EM, mientras que los niveles de TSH sérica incrementaron. En contraste con lo observado en la RE aguda, la disminución de TRH en la EM junto con el aumento de TSH en suero pudiera apoyar un incremento en la liberación del TRH hipotalámico que, a diferencia de situaciones como la exposición al frío o la succión, no se ve acompañado de una estimulación en la biosíntesis de TRH (Uribe *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 2001; Cote-Vélez *et al.*, 2005). Sin embargo, por tratarse de una situación crónica, los bajos niveles en el péptido pudieran ser consecuencia de los bajos niveles de RNAm y la liberación de TSH ser controlada por otros efectores. Por ejemplo, la NA estimula de manera rápida la secreción de TSH actuando sobre sus receptores  $\alpha$ -adrenérgicos localizados en la hipófisis; el bloqueo de estos adrenoreceptores previene la liberación de TSH de la hipófisis (Langer *et al.*, 1983). El estrés por RE y el asilamiento prolongado activan el sistema NA/A del tallo cerebral y otras regiones del cerebro (Dronjak *et al.*, 2004).

En las dos condiciones de RE disminuyó rápida y transitoriamente la expresión del RNAm de pro-TRH en el PVN sin que esto pueda ser explicado por un efecto retroalimentador de las hormonas tiroideas ya que éstas no fueron modificadas. Situaciones de estrés metabólico como el ayuno y la restricción alimentaria inhiben la expresión de pro-TRH en el PVN aún cuando los niveles de hormonas tiroideas están disminuidos (van Haasteren *et al.*, 1995; de Gortari *et al.*, 2000). Si bien en estas condiciones de demanda energética se ha atribuido el efecto a la disminución de leptina (Legradi *et al.*, 1997), altos niveles de CORT pueden también participar en esta inhibición (van Haasteren *et al.*, 1995). La administración de CORT en ratas adrenalectomizadas inhibe la expresión de TRH en el PVN (Kakucska *et al.*, 1995) y se ha establecido una correlación negativa entre CORT y el RNAm de pro-TRH y la actividad del eje HHT (Helmreich *et al.*, 2005). En nuestras condiciones, la expresión inhibida de TRH se observó sólo a tiempos cortos, desapareciendo a las 24 h a pesar de que los niveles de CORT permanecieron elevados

(aproximadamente 50% sobre los niveles basales) lo que sugiere la participación de un componente neural, el cual se desconoce hasta el momento.

Por el momento sería demasiado especulativo sugerir qué eventos neurales están involucrados ya que por ejemplo, el neuropéptido Y, la proteína reguladora de agouti (AGRP), transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART), hormona estimuladora de melanocitos (MSH), provenientes del núcleo arcuato regulan los niveles del RNAm de pro-TRH (Lechan y Fekete, 2006). El CRH también inhibe la expresión de TRH en el PVN, indirectamente vía estimulación de somatostatina (River *et al.*, 1985) o directamente mediante conexiones sinápticas entre neuronas CRHérgicas y TRHérgicas (Hisano *et al.*, 1993). Si bien, en este trabajo encontramos incremento en la expresión de CRH y disminución en la de TRH en el PVN por efecto de RE aguda y crónica (este último sólo transitoriamente), quedaría por definir el origen de las neuronas CRHérgicas que pudieran controlar la expresión del TRH. El TRH ejerce sus efectos a través de la activación de sus receptores, los cuales son modulados de manera homóloga en la hipófisis. Se conoce poco de su regulación en SNC, a diferencia de lo reportado para el CRH-R1. Encontramos que RE aguda y el aislamiento agudo y crónico incrementan la expresión de TRH-R1 en el PVN a pesar de que las neuronas TRHérgicas parecen estar inhibidas. Se ha propuesto que TRH-R1 participa en la señalización del TRH en diferentes regiones del cerebro con funciones neuroendócrinas como el PVN y el arcuato (Calzá *et al.*, 1992). Situaciones como la lactancia incrementan la expresión de TRH-R1 en el PVN y la amígdala (Fjeldheim *et al.*, 2005) o después de 1 h de exposición al frío (resultados de nuestro laboratorio) sin embargo, se desconoce aún el significado fisiológico de estos cambios.

Nuestros resultados indican que la secreción de TSH y la actividad de las neuronas TRHérgicas en el PVN responden de manera diferente al estrés agudo y crónico por RE, pero en ambas condiciones las respuestas son transitorias, sugiriendo la participación de la regulación por estímulos neurales.

### **VII.3.-El GR como transductor de los efectos de glucocorticoides.**

Como se mencionó en la introducción, el receptor de glucocorticoides (GR) es el que modula los efectos de estas hormonas cuando, en consecuencia a un estímulo estresante,

suben los niveles basales. La expresión de GR (niveles de RNAm y de proteína) se regula tanto por los mismos glucocorticoides como por influencias neurales de manera tejido-específico. Los GC son importantes en la modulación de diferentes aspectos del miedo y la ansiedad y la consolidación de la memoria de estos estímulos aversivos, actuando sobre GR localizado en regiones del circuito del estrés involucradas en modular estas respuestas conductuales (McEwen *et al.*, 1986). En respuesta al estrés, los niveles del RNAm de GR disminuyen considerablemente en hipocampo y en menor grado, en hipotálamo (Kitraki *et al.*, 1999; Paskitti *et al.*, 2000; Makino *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 2004; Aguilar-Válles *et al.*, 2005). El hipocampo y la corteza prefrontal son regiones muy sensibles a los efectos de altas concentraciones de GC pues generan cambios morfológicos en sus dendritas afectando además de las conductas ya mencionadas, los procesos de memoria y aprendizaje. En este trabajo la expresión de GR en el hipocampo anterior y posterior no cambió, sugiriendo que nuestras condiciones de estrés no fueron tan severas.

No hay reportes del efecto de RE aguda o crónica sobre la expresión de GR en la amígdala. Nuestros resultados demuestran que RE modula negativamente la expresión del RNAm de GR en hipotálamo, amígdala y septum, sin afectar su expresión en el hipocampo (no se determinó en corteza prefrontal y tálamo).

En la amígdala, los GC actúan sobre los GR afectando la consolidación de la memoria a eventos emotivos (Roozendaal *et al.*, 2000), y la expresión del miedo condicionado (Corodimas *et al.*, 1994). Los GC tiene un efecto positivo sobre la expresión de CRH en la amígdala, mientras que en el PVN participan en el efecto de retroalimentación, inhibiendo la expresión de este neuropéptido (Makino *et al.*, 1994). La disminución de la expresión de GR en contraste con el incremento en la expresión de CRH en la amígdala sugiere que el efecto es mediado por influencias neuronales. La amígdala tiene un papel importante en regular los efectos de los GC sobre estas regiones y sobre las estructuras tálamo-corticales importantes para el procesamiento de los estímulos emotivos (Erickson *et al.*, 2003). De esta forma la disminución de la expresión de GR observada en la amígdala puede interpretarse como un mecanismo adaptativo para evitar los efectos negativos de los incrementos crónicos de GC y evitando la consolidación de eventos negativos y la reacción exacerbada de la conducta de miedo y ansiedad.

Por su parte, el septum está asociado con la atenuación de la retroalimentación negativa de los GC participando en la desregulación de la actividad del eje HHA durante el estrés crónico. Observamos una disminución paulatina de los niveles de RNAm de GR a los 7 días y menor, a los 14.

Es importante enfatizar que la mayoría de las publicaciones utilizando ya sea el modelo de RE o de IMO omiten la influencia del aislamiento, nuestros resultados permiten distinguir el efecto del aislamiento, considerado por sí solo un estrés psicológico (Miachon *et al.*, 1993; Sánchez *et al.*, 1998). Varios de los cambios observados en la expresión de los genes del estrés en el PVN y la expresión de GR en la amígdala en el grupo aislado fueron similares a RE, sugiriendo una respuesta común a situaciones de estrés psicológico siendo probablemente una diferencia sólo de intensidad del estrés.

#### **VII.4.- Respuesta de las neuronas CRHérgicas y TRHérgicas del sistema límbico.**

Nuestros resultados muestran que la expresión de los elementos de la transmisión TRHérgica y CRHérgica están regulados diferencialmente por el estrés psicológico agudo y crónico en regiones del circuito del estrés involucradas en la manifestación y regulación de la conducta de ansiedad y miedo.

Podemos inferir que hay modulación en la actividad de las neuronas peptidérgicas cuando aumenta la liberación del péptido y va acompañada de incremento en la expresión del RNAm de pro-péptido, y regulada la expresión de sus receptores o del mecanismo de inactivación. Con base en estos parámetros podemos afirmar que en respuesta al estrés causado por RE aguda, se activaron las neuronas CRHérgicas del PVN y la amígdala ya que la expresión de CRH incrementó en estas regiones como se ha reportado (Kalin *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1998); en contraste, se inhibió la actividad de las neuronas TRHérgicas del PVN y de la corteza prefrontal (aumentó TRH y disminuyó la expresión de pro-TRH). En la amígdala sólo incrementó el contenido de TRH sin que llegara a modificarse la expresión de TRH, sugiriendo inhibición de la liberación del péptido. En la condición crónica, la amígdala fue la única región donde disminuyó la expresión de TRH e incrementó el contenido del péptido de manera específica a RE, apoyando una inhibición de la actividad de las neuronas TRHérgicas, mientras que la expresión de CRH incrementó. En la corteza

prefrontal los cambios encontrados sugieren activación de las neuronas TRHérgicas (aunque no hay cambios en el contenido de TRH) contraria a la disminución de la expresión de CRH y CRH-R1. Efectos contrarios se observaron también en el PVN donde la actividad de las neuronas TRHérgicas parece estar disminuida (disminuye el contenido de TRH y la expresión de pro-TRH) y las de CRH, incrementada. En el tálamo los cambios encontrados nos indican que el TRH está siendo liberado y posiblemente a las 24 hrs las neuronas TRHérgicas se encuentren activadas (aunque la expresión de TRH no cambia). En todas estas regiones los cambios en la expresión de TRH fueron rápidos (a los 45 min) y transitorios, implicando regulación neural.

#### **VII.5.- Posible significado fisiológico de la activación de las neuronas peptidérgicas en el sistema límbico.**

##### *A) Amígdala*

La administración de CRH en amígdala reproduce los efectos de la estimulación eléctrica amigdalina en el despliegue de conductas de miedo y ansiedad (Liang y Lee, 1988; Elkabir *et al.*, 1990). La activación de la expresión de CRH en CeA y su liberación se ha tomado como un marcador de estrés psicológico (Kalin *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1998; Merali *et al.*, 1998). El incremento en la expresión de CRH durante RE aguda puede involucrarlo en la asignación de significado a los estímulos emocionales percibidos y generar las conductas adaptativas relacionadas (Quirk *et al.*, 2003; Akirav *et al.*, 2005).

Los efectos del estrés crónico sobre la expresión de CRH en la amígdala dependen del paradigma. Algunos autores reportan incremento en su expresión por efecto del estrés social crónico (ratas subordinadas) (Albeck *et al.*, 1997) pero no por RE (Mamalaki *et al.*, 1992). Sin embargo encontramos que RE crónica incrementó la expresión de CRH a las 24 hrs pero no a los 45 min, como ocurrió en la condición aguda, sugiriendo que el CRH en la amígdala responde a RE aguda y crónica a tiempos diferentes. En condiciones de estrés crónico la expresión de CRH en la amígdala está relacionada con la conducta de ansiedad como la causada por RE crónica (Bhatnagar *et al.*, 2003).

El CRH actúa sobre su receptor CRH-R1 para la expresión de la conducta de ansiedad (Steckler y Holsboer, 1999) no sólo en la amígdala sino en otras regiones del

sistema límbico (Iredale *et al.*, 1996). De acuerdo a lo reportado (Makino *et al.*, 1999) la expresión de CRH-R1 en la amígdala no respondió a RE, sugiriendo que el CRH liberado en la amígdala actúa en otras regiones que expresen CRH-R1 como pudieran ser las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus o neuronas del hipocampo, la corteza prefrontal o el septum. En estas tres últimas regiones disminuyó la expresión de CRH-R1 como lo reportado anteriormente (Iredale *et al.*, 1996).

*TRH.* La amígdala fue la única región de todas las analizadas donde los cambios encontrados en la expresión de TRH y el contenido del péptido nos permiten deducir que la actividad de las neuronas TRHérgicas se encuentra inhibida de manera específica por efecto de la RE crónica. En el caso de la RE aguda, los cambios en el contenido de TRH sólo nos permiten sugerir que disminuyó la liberación pero, al no modificarse la expresión de TRH no podemos afirmar que la actividad de las neuronas TRHérgicas esté inhibida; sería importante verificar tiempos más cortos.

En el modelo de enterramiento defensivo, que refleja la conducta de ansiedad, así como en el laberinto de cruz elevado, se encuentra inhibida la actividad de las neuronas TRHérgicas (disminución del RNAm de pro-TRH e incremento de TRH) (Gutiérrez Mariscal, 2005). Tomando en cuenta que la inyección i.c.v. de TRH disminuye la conducta de ansiedad (el tiempo de enterramiento y el tiempo requerido para reaccionar activamente ante los choques eléctricos) confirmando el papel atribuido al TRH como ansiolítico (Gutiérrez Mariscal, 2005), la inhibición de las neuronas TRHérgicas y la activación de las CRHérgicas durante RE crónica puede contribuir al desarrollo de la conducta de ansiedad.

Se observa un comportamiento opuesto en la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto en agua de Morris, donde la expresión de TRH incrementa en la amígdala mientras que la de CRH disminuye, sugiriendo activación de las neuronas TRHérgicas (Aguilar-Valles *et al.*, 2006) e inhibición de las CRHérgicas (Aguilar-Valles *et al.*, 2005) tanto en el animal entrenado para encontrar la plataforma oculta como en el control de nado. En este paradigma, la activación de las neuronas TRHérgicas pudiera contribuir a disminuir la ansiedad ocasionada por el estrés durante la prueba mejorando los procesos de memoria y aprendizaje espacial dependientes del hipocampo.

El conjunto de estos resultados apoyan un papel importante del TRH en la amígdala en regular las conductas emocionales inducidas por el estrés psicológico, probablemente contrarrestando los efectos del CRH. Esta hipótesis es apoyada por la existencia de un péptido críptico derivado del procesamiento de pro-TRH (178-199) el cual se ha visto inhibe la expresión de CRH en la amígdala (Redei *et al.*, 1995; Heinrichs *et al.*, 2004) y su administración central reduce la conducta de miedo (McGiven *et al.*, 1997). Además, la distribución anatómica de estos péptidos apoyan la posibilidad de que el TRH pudiese inhibir la actividad de las neuronas CRHérgicas ya que el RNAm de TRH se encuentra en los núcleos BLA mientras que terminales conteniendo el peptido y receptores de TRH se observan cerca de los núcleos CeA donde se sintetiza el CRH (Heuer *et al.*, 2000).

En la amígdala la expresión de los receptores a TRH no se modificó por efecto de RE aguda o crónica y no hay reportes de su modulación durante IMO o RE. Sin embargo la expresión de estos receptores es modulada diferencialmente de acuerdo al paradigma. En la prueba de ansiedad se incrementa la expresión de TRH-R2 pero no de TRH-R1; durante el estrés metabólico (restricción energética) disminuye la expresión de TRH-R1 mientras que la de TRH-R2 no cambia (Jaimes, 2006); la expresión de ambos receptores incrementa durante el desarrollo del kindling amigdalino (de Gortari *et al.*, 2005) pero disminuye en la prueba de aprendizaje espacial (Aguilar-Valles *et al.*, 2006). Nuestros resultados sólo nos permiten concluir que a los tiempos estudiados el estrés psicológico no regula la expresión de TRH-R1 ni de TRH-R2, pero sí la de PPII ya que disminuyó en respuesta a RE aguda; sería especulativo ahondar por el momento, sobre los efectores involucrados.

#### *B) Corteza prefrontal.*

La corteza prefrontal está involucrada en terminar con las respuestas de miedo a los estímulos aversivos cuando estos han acabado. Esta región es parte del circuito del miedo junto con la amígdala y los BNST (Morgan *et al.*, 1993). No se sabe si la expresión de CRH en la corteza prefrontal es regulada por GC, ni si la extinción del miedo implica inhibición de su expresión en esta región. Sin embargo, se ha visto que la inhibición de CRH-R1 impide la reaparición de miedos mitigados (Schulkin *et al.*, 2005). La disminución en la

expresión de CRH y CRH-R1 observadas indica que posiblemente están involucradas en la regulación de esta conducta.

La actividad de las neuronas TRHérgicas fue modulada en forma distinta e inespecífica por efecto de RE aguda y crónica. En la condición aguda las neuronas TRHérgicas están inhibidas (incrementa el contenido de TRH y disminuye la expresión de pro-TRH y TRH-R1) mientras que en la crónica están activadas (aumenta la expresión de pro-TRH y TRH-R2; aunque no cambia el contenido de TRH). En la corteza, el RNAm de la PPII es abundante y su expresión no es modulada por efecto del estrés psicológico agudo o crónico pero sí durante situaciones de estrés más severas y patológicas como modelos de epilepsia (kindling amígdalino) o ingesta de alcohol (de Gortari *et al.*, 2005).

En la corteza prefrontal se han encontrado cambios en el contenido de TRH por efecto de la exposición a un espacio novedoso. En el modelo de ansiedad el contenido de TRH incrementa tanto en el grupo que recibe el choque eléctrico como en el grupo que sólo es presentando ante el electrodo pero que no recibe el estímulo (Gutiérrez-Mariscal, 2005). La corteza prefrontal es importante en el procesamiento de los estímulos emocionales por lo que puede ser una región que responda de manera general a los estímulos psicológicos como la exposición a espacios novedosos. Probablemente el TRH en esta región este respondiendo a la manipulación y a la exposición a un ambiente novedoso (poner a los animales en una caja distinta a la habitual) y al lugar donde se realiza el experimento. Durante el estrés crónico, posiblemente el TRH este implicado en modular las conductas de miedo en la corteza prefrontal, regulando la actividad de la amígdala con la cual tiene conexiones recíprocas (Morgane *et al.*, 2006). Sin embargo, falta información para confirmar esta suposición.

### C) Tálamo.

Se ha postulado que el TRH modula las descargas epilépticas (funcionando como antiepiléptico) y que tiene un papel excitador, controlando la actividad de las neuronas del tálamo y los periodos de vigilia y sueño funcionando como un regulador intrínseco de la actividad del circuito tálamo-cortical (Broberger y McCormick, 2005). Esta región presentó cambios específicos a RE crónica en todos los elementos de la transmisión TRHérgica

(péptido, pro-TRH, TRH-R1, R2 y PPII). El contenido de TRH y la expresión de pro-TRH y TRH-R2 disminuyeron transitoriamente (a los 45 min) mientras que la expresión de TRH-R1 incrementó; algunos de estos efectos continuaron a las 24 hrs tiempo en el cual la expresión de PPII aumentó.

El tálamo muestra una alta concentración de sitios de unión para TRH; el RNAm de TRH-R2 se expresa abundantemente en los núcleos antero y centro medial, así como en el ventral posterior del tálamo donde también se observa la expresión de PPII. En cambio, el RNAm de TRH-R1 se localiza sólo en el paraventricular talámico y el RNAm del pro-TRH se encuentra únicamente en el núcleo reticular talámico (Heuer *et al.*, 2000). Debido a la distribución diferencial de los elementos que participan en la transmisión TRHérgica, no podemos asegurar que los cambios en la expresión del precursor se relacionen a cambios en el péptido maduro o, a los cambios en contenido y expresión de receptores y de PPII teniendo en cuenta que pudieran representar circuitos distintos.

La disminución en la expresión de TRH en condiciones de estrés psicológico crónico pudiera asociarse a una disminución en el estado de alerta, sin embargo durante la RE los animales no mostraron somnolencia.

El contenido talámico del péptido maduro puede ser un reflejo de menor síntesis (bajos niveles de RNAm encontrados) o, mayor liberación durante el período de RE. El TRH liberado pudiera ser responsable de la disminución en los niveles de RNAm de TRH-R2 como se ha demostrado *in vitro* (Gershengorn, 1993) y del incremento de TRH-R1. Ambos receptores se expresan en la misma región del tálamo, por lo que su regulación opuesta sugiere la participación de otros mecanismos de regulación, independientes al TRH, como la regulación heteróloga.

La actividad de las neuronas talámicas es estado dependiente, cambiando durante la transición del estado de sueño a vigilia. Estudios *in vitro* con células talámicas indican que la exposición al TRH aumenta la depolarización de las células aumentando la resistencia de la membrana, regulando su frecuencia de disparo a un modo tónico, actividad asociada a los estados de vigilia (Broberger y McCormick, 2005). La liberación del TRH en el tálamo durante RE crónica pudiera estar implicado en aumentar los estados de vigilia y alerta,

regulando la actividad de las neuronas talámicas permitiendo una constante transferencia de los estímulos sensoriales (de este importante sitio de relevo) a otras zonas corticales.

Sin embargo, no podemos descartar que el TRH liberado del tálamo este actuando en otras regiones. El tálamo tiene conexiones recíprocas con la corteza prefrontal (Morgane *et al.*, 2006); formando parte del circuito del miedo y control de la ansiedad. El TRH liberado del tálamo puede estar actuando en esta región, posiblemente a través del TRH-R2, (explicando el incremento en su RNAm ocurrido en la corteza prefrontal), hipótesis que requiere ser confirmada. Se sabe que la corteza prefrontal y el tálamo se activan, después de la administración i.c.v de TRH incrementando la expresión de c-fos (Otake *et al.*, 2000).

En este trabajo encontramos que la neurona TRHérgica se encuentra activada en el circuito tálamo-cortical durante situaciones de estrés crónico psicológico; circuito involucrado en regular los aspectos fisiológicos y conductuales (miedo y ansiedad) de la respuesta al estrés crónico, probablemente contrarrestando los efectos ansiogénicos del CRH amigdalino.

#### *D) Circuito septo-hipocampal.*

Este circuito está implicado en los procesos de aprendizaje y memoria en los cuales se han implicado al TRH y CRH (Abidin *et al.*, 2004; Kittraki *et al.*, 2004), a demás es el sustrato anatómico donde el TRH tiene efectos analépticos (Horita *et al.*, 1998). En este circuito los elementos de la vía TRHérgica no fueron modulados por RE crónica (14 días), mientras que la expresión de CRH aumentó sólo en la región anterior del hipocampo. El septum fue la única región donde el contenido de TRH disminuyó de manera específica por efecto de 7 días de RE, sin afectar los demás elementos TRHérgicos. En el septum el péptido maduro proviene de otras regiones como del hipotálamo lateral, del área preóptica y del BNST (Ishikawa, 1986); posiblemente estos cambios en el contenido de TRH sean el resultado de modulación del TRH en otras regiones del cerebro como las mencionadas y las cuales no fueron analizadas en este trabajo.

En el hipocampo las neuronas TRHérgicas se activan sólo en el grupo entrenado para la prueba de aprendizaje espacial en el laberinto en agua de Morris mientras que las de CRH se activan tanto en el grupo entrenado como en el control de nado (Aguilar-Valles *et*

*al.*, 2005 y 2006). Nuestros resultados sugieren que el TRH en el hipocampo no es modulado por el estrés psicológico, pero sí el CRH.

### VII.6.-El TRH como regulador homeostático en el SNC durante situaciones de estrés.

El TRH y el CRH son importantes para mantener la homeostasis en el organismo, ambos péptidos tienen propiedades neuromoduladoras en el SNC. En situaciones de estrés, el equilibrio se altera y la expresión de CRH y TRH es regulada diferencialmente. Durante el estrés agudo la activación de las neuronas CRHérgicas (en el PVN y amígdala) y la inhibición de las TRHérgicas (en el PVN, amígdala) posiblemente contribuye a dirigir la energía hacia la activación del eje HHA (secreción de GC y expresión de CRH) generando las respuestas fisiológicas y conductuales. Sin embargo, en el estrés crónico la expresión diferencial de CRH en la amígdala resulta en el desarrollo de patologías asociadas con estados de hiperactividad neuronal como la ansiedad, y coincide con la inhibición de las neuronas TRHérgicas. El TRH está respondiendo al estrés crónico en regiones como la amígdala, la corteza prefrontal y el tálamo; en algunas situaciones, posiblemente contribuya a regular la actividad neuronal excesiva de tipo CRHérgico, y a restablecer la homeostasis. El TRH no responde en el hipocampo donde parece estar implicado sólo en el aprendizaje y memoria (Aguilar-Valles *et al.*, 2006). Nuestros resultados apoyan la hipótesis propuesta por Gary *et al.*, 2003, en donde el TRH en el sistema límbico puede funcionar como modulador homeostático (Figura 19).

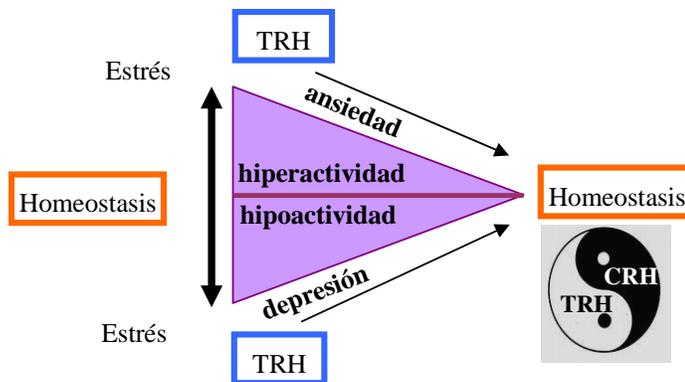


Figura 19. El TRH como regulador homeostático en el SNC. Modificado de Gary *et al.*, 2003.

## VIII.- Conclusiones

- 1.- La actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideo, es modulada de manera rápida y transitoria por la restricción de movimiento aguda y crónica; sin afectar la secreción de las hormonas tiroideas.
- 2.-La actividad de las neuronas TRHérgicas en el PVN, es modulada diferencialmente por la restricción de movimiento aguda y crónica, en ambos casos transitoriamente.
- 3.-Los elementos de la vía de transmisión TRHérgica en la amígdala, corteza prefrontal y el tálamo, son modulados diferencialmente por la restricción de movimiento aguda y crónica.
- 4.-En la amígdala la expresión de TRH y CRH es regulada por la restricción de movimiento crónica de manera opuesta; la inhibición de las neuronas TRHérgicas coincide con la activación de las CRHérgicas en un modelo que provoca ansiedad.
- 5.- Los elementos de la vía de transmisión TRHérgica no son modulados por la restricción de movimiento aguda y crónica en el septum o hipocampo (donde parece responder en el aprendizaje y memoria).

## IX.-Bibliografía

- Abidin I, Yargicoglu P, Agar A, Gumuslu S, Aydin S, Ozturk O, Sahin E. (2004) The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci*; 114:683-699.
- Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, Balderas I, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F, Joseph-Bravo P. (2005) Analysis of the stress response in rat trained in the water maze: Differential expression of corticotropin-releasing-hormone, CRH-R1, glucocorticoids receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinol*; 82:306-319.
- Aguilar-Valles A, Sanchez E, de Gortari P, García-Vázquez A, Ramirez-Amaya V, Bermudez-Rattoni F, Joseph-Bravo P. (2006) The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem Int*. En prensa.
- Aguilera G. (1994) Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Front Neuroendocrinol*; 15:321-350.
- Akil H, Cappeau S, Cullinan WE, Lechan R, Toni R, Watson S, Moore R. (1999) Neuroendocrine System I: Overview Thyroid and Adrenal Axes. En Zigmund M, Bloom F, Landis S, Roberts J, Squire L. *Fundamental Neuroscience Academic Press*. pp: 1127-1150.
- Akirav I, Gal RL. (2005) Involvement of the amygdala in the neuroendocrine and behavioral consequences of stress. En Steckler T, Kalin NH, Reul JM (Eds), *Handbook of stress and the Brain Vol. 5, Elsevier*. pp:793-805.
- Albeck DS, McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, Nikulina J, McEwen BS, Sakai RR. (1997) Chronic social stress alters levels of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin mRNA in rat brain. *J Neurosci*; 17:4895-4903.
- Amaral D.G. y M.P. Witter (1995) Hippocampal Formation. En: Paxinos, G. (Editor). *The Rat Nervous System*. 2a. edición. Academic Press. EUA. pp: 443-453.
- Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Astier H, Assenmacher I. (1989) Physiological evidence for alfa 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci Lett*; 100:169-174.
- Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. (1999) The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol*; 160:1-12.
- Ashworth R, Yu R, Nelson EJ, Dermer S, Gershengorn MC, Hinkle PM. (1995) Visualization of thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:512-516.

- Bhatnagar S, Huber R, Lazar E, Pych L, Vining C. (2003) Chronic stress alters behavior in the conditional defensive burying test: role of the posterior paraventricular thalamus. *Pharmacol Biochem Behav*; 76:343-349.
- Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. (1991) Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology*; 129:2714-2718.
- Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, Schally AV. (1969) The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl histidyl-proline amide. *Biochem Biophys Res Commun*; 37:705-710.
- Brady LS, Smith MA, Gold PW, Herkenham M. (1990) Altered expression of hypothalamic neuropeptide mRNA in food-restricted and food-deprived rats. *Neuroendocrinology*; 52:414-447.
- Broberger C, McCormick DA. (2005) Excitatory effects of thyrotropin-releasing hormone in the thalamus. *J Neurosci*; 25:1664-1673.
- Calfa G, Volosin M, Molina VA. (2006) Glucocorticoid receptor in lateral septum are involved in the modulation of the emotional sequelae induced by social defeat. *Behav Brain Res*; 172:324-332
- Calza L, Giardino L, Ceccatelli S, Zanni M, Elde R, Hokfelt T. (1992) Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience*; 51:891-909.
- Cao J, O'Donnell D, Vu H, Payza K, Pou C, Godbout C, Jakob A, Pelletier M, Lembo P, Ahmad S, Walker P. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*; 273:32281-32287.
- Carrasco GA, Van de Kar LD. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*; 463:235-272.
- Cizza G, Brady LS, Esclapes ME, Blackman MR, Gold PW, Chrousos GP. (1996) Age and Gender Influence Basal and Stress-Modulated Hypothalamic-Pituitary-Thyroidal Function in Fischer 344/N rats. *Neuroendocrinology*; 64:440-448.
- Chang FC y Opp MR. (2001) Corticotropin-releasing hormone (CRH) as a regulator of waking. *Neurosci Biobehav Rev*; 25:445-453.
- Charli JL, Vargas MA, Cisneros M, de Gortari P, Baeza MA, Jasso P, Bourdais J, Perez L, Uribe RM, Joseph-Bravo P. (1998) TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*; 6:45-57.
- Chomczynski P. (1987) Single-Step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*; 162:156-159.

- Colom LV. (2006) Septal networks: relevance to theta rhythm, epilepsy and Alzheimer's disease. *J Neurochem*; 96:609-623.
- Cone DR, Low MJ, Elmquist JK, Cameron JL. (2003) Hypothalamus and Pituitaria. *Neuroendocrinology*. en Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS. ed. *Williams Textbook of Endocrinology*. Tenth Edition. pp:81-176.
- Cook SC, Wellman CL. (2004) Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. *Inc. J Neurobiol*; 60:236-248.
- Corodimas KP, LeDoux JE, Gold PW, Schulkin J. (1994) Corticosterone potentiation of conditioned fear in rats. *Ann N Y Acad Sci*; 30:392-403.
- Coste SC, Murray SE, Stenzel-Poore MP. (2001) Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress. *Peptides*; 22:733-741.
- Cote-Velez A, Perez-Martinez L, Diaz-Gallardo MY, Perez-Monter C, Carreon-Rodriguez A, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2005) Dexametasone repressed cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription. Identification of a composite GRE and CRE in the TRH promoter. *J Mol Endocrinol*; 61:180-190.
- 
- Dagleish T. (2004) The emotional brain. *Nature*; 5:582-589.
- Dal-Zotto S, Marti O, Armario A. (2002) Is repeated exposure to immobilization needed to induce adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? Influence of adrenal factors. *Behav Brain Res*; 129:187-195
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. (2001) Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci*; 14:1143-1152.
- 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*; 679:144-150.
- de Gortari P, Joseph-Bravo P, Monroy-Ruiz J, Martinez A, Cisneros M, Fernandez Guardiola A. (1998) Brain thyrotropin-releasing hormone content varies through amygdaloid kindling development according to after discharge frequency and propagation. *Epilepsia*; 39:897-903.
- de Gortari P, González-Alzati ME, Cisnesor M, Joseph-Bravo P. (2000) Effect of Fasting on the Content of Thyrotropin-releasing-hormone and its mRNA in the Central Nervous System and Pyroglutamyl Peptidase II Activity in the Anterior Pituitary of Post-Weaned and Adult Rats. *Nutritional Neurosci*; 3:255-265.
- de Gortari P, Romero F, Cisneros M, Joseph-Bravo P. (2005) Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochem Int*; 46:347-356

- de Gortari P, Uribe RM, Garcia-Vazquez A, Aguilar-Valles A, Martinez A, Valdes A, Charli JL, Fernandez-Guardiola A, Joseph-Bravo P. (2006) Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochem Int*; 48:31-42.
- de Kloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. (1998) Brain Corticosteroid Receptor Balance in health and disease. *Endocrine Rev*; 19:296-301.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*; 6:463-475.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. (1997) Adaptation to prolonged or repeated stress: comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology*; 65:360-368.
- Dronjak S, Gavrilovic L, Filipovic D, Radojicic MB. (2004) Immobilization and cold stress affect sympatho-adrenomedullary system and pituitary-adrenocortical axis of rats exposed to long-term isolation and crowding. *Physiol Behav*; 81:409-415.
- Dunn JD. (1987) Differential plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the medial and lateral septal nuclei. *Neuroendocrinology*; 46:406-411.
- Dunn AJ, Berridge CW. (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev*; 5:71-100.
- Elkabir DR, Wyatt ME, Vellucci SV, Herbert J. (1990) The effects of separate or combined infusions of corticotrophin-releasing factor and vasopressin either intraventricularly or into the amygdala on aggressive and investigative behavior in the rat. *Regul Pept*; 28:199-214.
- Erickson K, Drevets W, Schulkin J. (2003) Glucocorticoid regulation of diverse cognitive functions in normal and pathological emotional states. *Neurosci Behav Rev*; 27:233-246.
- Fjeldheim AK, Hovring PI, Loseth OP, Johansen PW, Glover JC, Matre V, Olstad OK, Reppe S, Gordeladze JO, Walaas SI, Gautvik KM. (2005) Thyrotrophin-releasing hormone receptor 1 and prothyrotrophin-releasing hormone mRNA expression in the central nervous system are regulated by suckling in lactating rats. *Eur J Endocrinol*; 152:791-803.
- Fuchs E, Flugge G, Ohl F, Lucassen P, Vollmann-Honsdorf GK, Michaelis T. (2001) Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus. *Physiol Behav*; 73:285-291.
- Fuchs E, Flugge G. (2003) Chronic social stress: effects on limbic brain structures. *Physiol Behav*; 79:417-427.
- Fukuhara K, Kvetnansky R, Cizza G, Pacak K, Ohara H, Goldstein DS, Kopin IJ. (1996) Interrelations between sympathoadrenal system and hypothalamo-pituitary-

adrenocortical/thyroid systems in rats exposed to cold stress. *J Neuroendocrinol*; 8:533-541.

- Fujimoto J, Narayanan CS, Benjamin JE, Heinfliink M, Gershengorn MC. (1992) Mechanism of regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in stably transfected rat pituitary cells. *Endocrinology*; 130:1879-1884.
- French TA, Masserano JM, Weiner N. (1993) Influence of thyrotropin-releasing hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res*; 17:99-106.
- Gary KA, Sevarino KA, Yarbrough GG, Prange AJ Jr, Winokur A. (2003) The TRH hipótesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *J Pharmacol Exp Ther*; 305:410-416.
- Gershengorn MC (1993) Thyrotropin-releasing hormone receptor: cloning and regulation of its expression. *Recent Prog Horm Res*; 48:515-526.
- Gershengorn MC, Osman R. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptor. *Physiological Rev*; 142:2-10.
- Gutiérrez M, M. (2005) Participación de la hormona liberadora de tirotrópina en la conducta de ansiedad. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Harris RB, Gu H, Mitchell TD, Endale L, Russo M, Ryan DH. (2004) Increased glucocorticoid response to a novel stress in rats that have been restrained. *Physiol Behav*; 81:557-568.
- Hashimoto T, Wada T, Fukuda N, Nagaoka A. (1993) Effect of thyrotropin-releasing hormone on pentobarbitone-induced sleep in rats: continuous treatment with a sustained release injectable formulation. *J Pharm Pharmacol*; 45:94-97.
- Heinrichs SC, Min H, Tamraz S, Carmouche M, Boehme SA, Vale WW. (1997) Anti-sexual and anxiogenic behavioral consequences of corticotropin-releasing factor over expression are centrally mediated. *Psychoneuroendocrinology*; 22:215-224.
- Heinrichs SC, Koob GF. (2004) Corticotropin-releasing factor in brain: a role in activation, arousal and affect regulation. *J Pharmacol Exp Ther*; 311:427-440.
- Helmreich DL, Parfitt DB, Lu XY, Akil H, Watson SJ. (2005) Relation between the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis and the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during repeated stress. *Neuroendocrinology*; 81:183-92.
- Herman JP, Adams D, Prewitt C. (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*; 61:180-190.

- Herman JP, Cullinan WE. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *TINS*; 20:78-84.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*; 24:151-180.
- Heuer H, Schafer MK, O'Donnell D, Walker P, Bauer K. (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol*; 428:319-336.
- Hisano S, Fukui Y, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T, Shibasaki T. (1993) Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive- and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res*; 620:343-346.
- Horita A. (1998) An update on the CNS actions of TRH and its analogos. *Life Sci*; 62:1443-1448.
- Hsu DT, Chen FL, Takahashi LK, Kalin NH (1998) Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala and hypothalamic paraventricular nucleus: An in situ hybridization analysis. *Brain Research*; 788:305-310.
- Imaki T, Naruse M, Harada S, Chikada N, Imaki J, Onodera H, Demura H, Vale W (1996) Corticotropin-releasing factor un-regulates its own receptor mRNA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Mol Brain Res*; 38:166-170.
- Iredale PA, Terwilliger R, Widnell KL, Nestler EJ, Duman RS. (1996) Differential regulation of corticotropin-releasing factor1 receptor expression by stress and agonist treatments in brain and cultured cells. *Mol Pharmacol*; 50:1103-1110.
- Ishikawa K, Taniguchi Y, Kurosumi K, Suzuki M. (1986) Origin of Septal Thyrotropin-Releasing Hormone. *Neuroendocrinology*; 44:54-58.
- Jaimes L. (2006) Efecto en la anorexia por deshidratación en la expresión de los genes de TRH, CRH y sus receptores en el sistema límbico de rata. Tesis de Maestría. Fac. de Química. UNAM.
- Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T, Charli JL. (1998) Multifactorial Modulation of TRH Metabolism. *Cel Mol Neurobiol*; 18:231-247.
- Kakucska I, Qi Y, Lechan RM (1995) Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotrophin-releasing hormone. *Endocrinology*; 136:1795-2802.
- Kalin NH, Takahashi LK, Chen FL. (1994) Restraint stress increases corticotropin-releasing hormone mRNA content in the amygdala and paraventricular nucleus. *Brain Res*; 656:182-186.

- Karandrea D, Kittas C, Kitraki E. (2002) Forced swimming differentially affects male and female brain corticosteroid receptors. *Neuroendocrinology*; 75:217-226.
- Kiss A, Adameova A, Kubovcakova L, Jamal B, Bacova Z, Zorad S, Tybitanclova K, Kvetnansky R, Strbak V. (2004) Effect of Immobilization on In Vitro Thyrotropin-Releasing-Hormone Release from Brain Septum in Wild-Type and Corticotropin-Releasing Hormone Knock-out mice. *Ann NY Acad Sci*; 1018:207-213.
- Kitraki E, Karandrea D, Kittas C. (1999) Long-lasting effects of stress on glucocorticoid receptor gene expression in the rat brain. *Neuroendocrinology*; 69:331-338.
- Kitraki E, Kremmyda O, Youlatos D, Alexis M, Kittas C. (2004) Spatial performance and corticosteroid receptor status in the 21-day restraint stress paradigm. *Ann N Y Acad Sci*; 1018:323-327.
- Kubek MJ, Knoblach SM, Sharif NA, Burt DR, Buterbaugh GG, Fuson KS. (1993) Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann Neurol*; 33:70-76.
- Langer P, Foldes O, Kvetnansky R, Culman J, Torda T, El Daher F. (1983) Pituitary-thyroid function during acute immobilization stress in rats. *Exp Clin Endocrinol*; 82:51-60.
- Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH (1986) Thyrotropin-releasing-hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science*; 231:159-161.
- Lechan RM, Toni R. (1992) Thyrotropin-releasing hormone neural system in the central nervous system. En Nemeroff CB (ed): *Neuroendocrinology*. CRC Press, EUA. pp:279-330.
- Lechan RM, Fekete C. (2006) The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in brain Res*. Chapter 12: 209-235.
- LeDoux JE, Farb C, Ruggiero DA. (1990) Topographic organization of neurons in the acoustic thalamus that Project to the amygdala. *J Neurosci*; 10: 1043-1054.
- LeDoux JE. (1995) Emotion: clues from the brain. *Annu Rev Psychol*; 46:209-235.
- Lee SL, Stewart K, Goodman RH. (1988) Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem*; 263:16604-16609.
- Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. (1997) Leptine prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing-hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinol*; 138:2569-2576.
- Liang KC, Lee EH (1988) Intra-amygdala injections of corticotropin releasing factor facilitate inhibitory avoidance learning and reduce exploratory behavior in rats. *Psychopharmacology*; 96:232-236.

- Lovenberg TW, Liaw CW, Grigoriadis DE, Clevenger W, Chalmers DT, De Souza EB, Oltersdorf T. (1995) Cloning and characterization of a functionally distinct corticotropin releasing factor receptor subtype from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92:836-840.
- Ma XM, Levy A, Lightman SL. (1997) Emergence of an isolated arginine vasopressin (AVP) response to stress after repeated restraint. *Endocrinology*, 138:4351-4357.
- Ma MX, Lightman SL. (1998) The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J Physiol*; 510:605-614.
- Ma XM, Lightman SL, Aguilera G. (1999) Vasopressin And Corticotropin-Releasing Hormone Gene Responses to Novel Stress in Rats Adapted to Repeated Restraint. *Endocrinology*; 140:3623-3632.
- Makino S, Gold PW, Schulkin J. (1994) Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*; 640:105-112.
- Makino S, Schulkin J, Smith MA, Pacak K, Palkovits M, Gold PW. (1995) Regulation of corticotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in the rat brain and pituitary by glucocorticoids and stress. *Endocrinology*; 136:4517-4525.
- Makino S, Shibasaki T, Yamauchi N, Nishioka T, Mimoto T, Wakabayashi I, Gold PW, Hashimoto K. (1999) Psychological stress increased corticotropin-releasing hormone mRNA and content in the central nucleus of the amygdala but not in the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. *Brain Res*; 850:136-144
- Makino S, Hashimoto K, Gold PW (2002) Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol Biochem Behav*; 73:147-158.
- Mamalaki E, Kvetnansky R, Brady LS, Gold PW, Herkenham M. (1992) Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotropin releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic acid levels in rat brain. *J Neuroendocrinol*; 4:689-699.
- McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. (1986) Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev*; 66:1122-1188.
- McEwen BS. (2000) The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res*; 886:172-189.
- McGivern RF, Rittenhouse P, Aird F, Van de Kar LD, Redei E. (1997) Inhibition of stress induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat by prepro-thyrotropin-releasing hormone. *J Neurosci*; 17:4886-4894.

- McIntyre DC, Kent P, Hayley S, Merali Z, Anisman H. (1999) Influence of psychogenic and neurogenic stressors on neuroendocrine and central monoamine activity in fawn and show kindling rats. *Brain Res*; 840:65-74.
- Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D, Anisman H. (1998) Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J Neurosci*; 18:4758-4766.
- Miachon S, Rochet T, Mathian B, Barbagli B, Claustrat B. (1993) Long-term isolation of Wistar rats alters brain monoamine turnover, blood corticosterone, and ACTH. *Brain Res Bull*; 32:611-614.
- Mizoguchi K, Ishige A, Aburada M, Tabira T. (2003) Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*; 119:887-897.
- Morgan MA, Romanski LM, LeDoux JE. (1993) Extinction of emotional learning: contribution of medial prefrontal cortex. *Neurosci Lett*; 163:109-113.
- Morgane PJ, Galler JR, Mokler DJ. (2005) A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Prog Neurobiol*; 75:143-160.
- Morgane PJ, Mokler DJ. (2006) The limbic brain: Continuing resolution. *Neurosci Biobehav*; 30:119-125.
- Morzorati S. y M.J. Kubek. (1993) The effect of TRH on ethanol-induced sedation in alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Neuropeptides*; 25:283-287.
- Nillni EA, Sevarino KA. (1999) The biology of pro-Thyrotropin-Releasing Hormone Derived Peptides. *Endocrine Rev*; 20:599-648.
- O'Dowd BF, Lee DK, Huang W, Nguyen T, Cheng R, Liu Y, Wang B, Gershengorn MC, George SR. (2000) TRH-R2 Exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol Endocrinol*; 14:183-193.
- O'Leary R, O'Connor B. (1995) Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem*; 65:953-963.
- Otake K, Nakamura Y. (2000) Sites of activation of thyrotropin-releasing hormone on central nervous system revealed by expression of the immediate-early gene c-fos in the rat. *Neuroscience*; 95:1167-1177.
- Palkovits M y Brownstein MJ. (1988) *Maps and Guide to Microdissection of the rat Brain*. Elsevier. New York.
- Paskitti ME, McCreary BJ, Herman JP. (2000) Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. *Brain Res Mol Brain Res*; 80:142-152.

- Pitman DL, Ottenweller JE, Natelson BH. (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiol Behav*; 43:47-55.
- Pollitt E. (1996) Timing and vulnerability in research on malnutrition and cognition. *Nutr Rev*; 54:549-555.
- Popovic V. (1988) Adaptation to restraint in the rat. *Physiologist*; 3:S65-76.
- Quirk GJ, Gehlert DR. (2003) Inhibition of the amygdala: key to pathological states?. *Ann NY Acad Sci*; 958:263-272.
- Raber J. (1998) Detrimental effects of chronic hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. From obesity to memory deficits. *Mol Neurobiol*; 18:1-22.
- Ramos A, Mormede P. (1998) Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. *Neurosci Behav Rev*; 22:33-57.
- Rebolledo D. (2006) Estudio del efecto del estrés agudo sobre el metabolismo del neuropéptido TRH en el sistema límbico. Tesis de Licenciatura, Fac. de Ciencias, UNAM.
- Redei E, Hilderbrand H, Arid F. (1995) Corticotropin release-inhibiting factor is preprthyrotropin releasing hormone (178-199). *Endocrinology*; 136:3557-3563.
- Rivier C, Vale W. (1985) Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology*; 117:2478-2482.
- Ely DR, Dapper V, Marasca J, Correa JB, Gamaro GD, Xavier MH, Michalowski MB, Catelli D, Rosat R, Ferreira MB, Dalmaz C. (1997) Effect of Restrain Stress on Feeding Behavior of rats. *Physiol Behav*; 61:395-398.
- Roozendaal B. (2000) Glucocorticoids and the regulation of memory consolidation. *Psychoneuroendocrinology*; 25:213-238.
- Sanchez MM, Aguado F, Sanchez-Toscano F, Saphier D. (1998) Neuroendocrine and immunocytochemical demonstration of decreased hypothalamus-pituitary-adrenal axis responsiveness to restrained stress after long-term social isolation. *Endocrinology* 139:579-587.
- Sanchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL, Joseph-Bravo P. (2001) Differential Responses of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Neurons to Cold Exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus. *Neuroendocrinology*; 74:407-422.
- Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. (2000) Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Progress Brain Res*; 122:61-78.

- Schulkin J, Morgan MA, Rosen JB. (2005) A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends Neurosci*; 28:629-635.
- Smagin GN, Heinrichs SC, Dunn AJ. (2001) Role of the CRH in behavioral responses to stress. *Peptides*; 22:713-724.
- Smith GW, Aubry JM, Dellu F, Contarino A, Bilezikjian LM, Gold LH, Chen R, Marchuk Y, Hauser C, Bentley CA, Sawchenko PE, Koob GF, Vale W, Lee KF. (1998) Corticotropin Releasing Factor Receptor 1-deficient mice display decreased anxiety, impaired stress response, and aberrant neuroendocrine development. *Neuron*; 20:1093-1102.
- Stocca G y Nistri A. (1996) The neuropeptide thyrotropin-releasing hormone modulates GABAérgicas synaptic transmission on pyramidal neurons of the rat hippocampal slice. *Peptides*; 17:1197-1202.
- Strupp BJ, Levitsky DA. (1983) Early brain insult and cognition: a comparison of malnutrition and hypothyroidism. *Dev. Psychobiol*; 16:535-549.
- Suarez M, Maglianesi MA, Perassi NI. (1998) Involment of the anterodorsal Thalamic Nucleic on the Hypophysoadrenal response to chronic stress. *Physiol Behav*; 64:111-116.
- Steckler T, Holsboer F. (1999) Corticotropin-releasing hormone receptor subtypes and emotion. *Biol Psychiatry*; 46:1480-1508.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. (1983) Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemecal study. *Neuroendocrinology* 36:165-186.
- Turakulov Y, Burikhanov R, Pakitdinov P, Myslitskaya A. (1994) Influence of immobilization stress on the levels of thyroid hormones *Neurosci Behav Physiol*; 24:462-464.
- Thompson B.L. y J.B. Rosen. (2000) Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides*; 34:38-44.
- Tsigos C. y Chrousos G. P. (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*; 53:865-871.
- Turnbull AV, Rivier C. (1997) Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein and related peptides. *Proc Soc Exp Biol Med*; 215:1-10.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. (1993) Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*; 58:140-145.

- Uribe RM, Joseph-Bravo P, Charli JL. (1995) Pups removal enhances thyrotropin-releasing hormone mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur J Endocrinol*; 133:354-360.
- Van Bockstaele EJ, Colago EE, Valentino RJ. (1998) Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: substrate for the coordination of emotional and cognitive limbs of the stress response. *J Neuroendocrinol*; 10:743-757.
- van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Temen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, Bauer K, Visser TJ, and Greef WJ. (1995) Starvation induced changes in hypothalamic content of prothyrotropin-releasing-hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic releasing of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol*; 145:143-150.
- van Gaalen MM, Stenzel-Poore MP, Holsboer F, Steckler T. (2002) Effects of transgenic overproduction of CRH on anxiety-like behavior. *Eur J Neurosci*; 15:2007-20015.
- Valles A, Marti O, Armario A. (2003) Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: transcriptional evidence for a progressive desensitization process. *Eur J Neurosci*; 18:1353-1361.
- Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL. (1994) Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology*; 60:323-330.
- Viau V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes. *J Neuroendocrinol*; 14:506-513.
- Wallace DM, Magnuson DJ, Gray TS. (1992) Organization of amygdaloid projections to brainstem dopaminergic, noradrenergic, and adrenergic cell groups in the rat. *Brain Res Bull*; 28:447-454.
- Yadin E, Thomas E. (1996) Stimulation of the lateral septum attenuates immobilization-induced stress ulcers. *Physiol Behav*; 59:883-886.
- Yen PM. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*; 81:1079-1142.
- Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovacs KJ, Toth Z, Makara GB. (2003) Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab*; 285:E1110-E1117.
- Zoeller RT, Simongi A, Bulnario O, Fletcher KL. (1995) Effects of acute ethanol administration and cold exposure on the hypothalamic pituitary axis. *Endocrine*; 3:39-47.