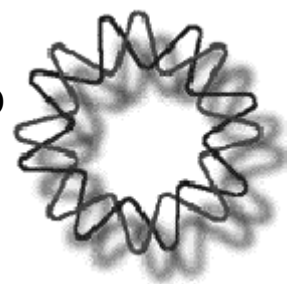




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Participación de las neuronas TRHérgicas
amigdalinas en la conducta de ansiedad”.**

**Tesis que para obtener el Grado de
DOCTORA en CIENCIAS**

**Presenta:
M. en C. Mariana Gutiérrez Mariscal**

**Directora de tesis:
Dra. Patricia Joseph Bravo.**

Mayo de 2010; Cuernavaca, Morelos.



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 se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología Molecular, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Patricia Joseph Bravo.

Durante la realización de este proyecto se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becario: 168002 y proyecto: 83363), de DGAPA-PPIIT IN215507 y del Programa de Fomento a la Graduación de la Coordinación de Estudios de Posgrado, UNAM.

Agradecimientos

A la UNAM, Institución de la que orgullosamente he formado parte desde los 4 meses de edad, que me ha abierto las puertas del mundo y me ha enseñado a ser un mejor ser humano.

A la Dra. Patricia Joseph Bravo, por dirigir este trabajo, por todo el apoyo y enseñanzas, con mucho cariño. Admiro mucho la forma en la que compartes tu conocimiento, tus ideas, tus opiniones, tus críticas, tus experiencias y hasta tu humor tan personal con la gente que te rodeamos. Gracias por dirigir esta Tesis Doctoral y por poner a mi alcance todos los recursos posibles.

Al Dr. Jean Louis Charli Casalonga, a la Dra. Patricia de Gortari Gallardo y a la Dra. Rosa Maria Uribe, por sus valiosas aportaciones a este trabajo, porque siempre pude contar con ustedes, los respeto y admiro mucho como académicos pero sobretodo, como personas.

Al Comité Tutorial: Dra. Carolina López Rubalcava y Dra. Gina Quirarte por su participación crítica a lo largo de este proyecto.

Al Jurado de Examen: Dr. Raúl Aguilar Roblero, Dra. Ma. Isabel Miranda Saucedo, Dra. Leonor Pérez Martínez y Dr. Víctor Ramírez Amaya.

A los miembros del Laboratorio de Neurobiología Molecular: Dra. Antonieta Cote-Vélez, Dra. Martha Díaz, Dr. Miguel Angel Vargas, Dr. Víctor Rodríguez, Dra. Edith Sánchez Jaramillo. En especial, a la Quim. Fidelia Romero y al Q.F.B. Miguel Cisneros Cruz por su invaluable apoyo en las técnicas de RT-PCR y RIA. A Elena Martell, Miguel Angel Olvera, Manuel Villa por su valiosa ayuda técnica.

A los compañeros del laboratorio: Iván, Cristina, Erick, Carlos, Adrián, Javier, Israim, Gracias por hacer del lugar de trabajo un lindo lugar.

A la Unidad del Bioterio de IBT: M.V.z. Elizabeth Mata, M.V.z. Graciela Cabeza, T.A., I.B.I. Marcela Ramírez, T.A. Rubén Blancas, María Xóchitl González, Pablo Juárez, Abel Ortiz, Miguel A. Trujillo y en particular a Sergio González, por quien los animales utilizados en este trabajo estuvieron siempre en las mejores condiciones, agradezco su invaluable apoyo en todos los experimentos realizados para este trabajo.

A la unidad de Docencia del IBT: Ing. Jalil Saab, Lic. Antonio Bolaños y Gloria Villa, por facilitar significativamente los trámites desde inscripción hasta titulación pasando por becas, congresos, estancias y un largo etc.

A la unidad de Cómputo del IBT, en particular al Ing. Roberto Rodríguez Bahena por su apoyo durante las videoconferencias.

A la unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas del IBT, en particular al M. en C. Eugenio López Bustos por proporcionar los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

A los Sres. Antonio Villa, Dagoberto Romero y José Ruíz por su apoyo en el transporte de documentos y a veces, hasta ratas. A Maria Guadalupe López Aguilar, por su constante apoyo en cuestiones administrativas.

A la Lic. Ma. de Lourdes Lara Ayala y a Ana María Escalante Gonzalbo, responsables de las Unidades de Videoconferencia del Instituto de Neurobiología y del Instituto de Fisiología Celular, respectivamente.

Agradezco el amor y apoyo incondicional de mi familia: Gina, Pedro, Lili, Roberto y el nuevo ciudadano del mundo, Emiliano a quien agradezco la felicidad que su sola existencia nos ha dado.

Agradezco a la GFM, por su presencia, por tanto cariño: Rosana, Miguel Angel, Daniela y Mikis; Ricardo, Juan, Ana y Pedro; Tonio, Rosana y Sergio; Tio Vale y Familia y por supuesto a mi Abulelita mujer que nunca deja de sorprenderme, a quien admiro y quiero infinitamente. Agradezco a mi “más reciente” familia Ma Rosa, Tomás, Adriana, Luis, Marta y Margarita, por su cariño, generosidad y apoyo.

Alejandro, agradezco que la vida y nosotros nos demos la oportunidad de compartimos, de aprender y crecer juntos, de conocernos y aún así, queremos tanto! gracias por aguantarme en esa etapa muchas veces, de pesadilla.

Gracias a Angeles, acabamos el maratón del terror juntas! eso fue lo mejor, gracias por estar ahí siempre Brujis, te quiero y admiro mucho, felicidades Dra!!

Gracias a Julia, Catalina, Adriana, por estar conmigo en momento buenos, malos y rutinarios, por crear una familia y un hogar en Cuernavaca, por ésto mismo, a Laura Hinojosa. A Lakshmi, Betín, Francisco, Mari, Ere, Tuchick, Rebe, gracias por tantos años de amistad. A Arlene, por compartir muchos momentos en el laboratorio y aunque nos hayas cambiado. A Adolfo, Aubin, Viviana, Paul, Marel, Andrés, Bernardo, Sergio, Luis, por crear diversión en medio de tanta repetición, es meritorio. Estos años no hubieran sido tan gozables sin ustedes, Gracias!

Dedico este trabajo a la UNAM y a mis padres.

ÍNDICE GENERAL

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumen	v
Abstract	vi
I. INTRODUCCIÓN	1
1. <i>El estrés y la ansiedad</i>	2
2. <i>Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)</i>	8
3. <i>El eje Tiroideo y el estrés</i>	9
4. <i>El TRH del SNC</i>	10
5. <i>Regulación de la transmisión TRHérgica, estudios a partir de la célula neuroendócrina</i>	12
6. <i>Regulación de la transmisión TRHérgica en el SNC</i>	13
II. ANTECEDENTES	
1. <i>Estudios sobre la función de circuitos TRHérgicos centrales</i>	15
2. <i>El TRH amigdalino y la conducta de ansiedad</i>	16
III. JUSTIFICACIÓN	17
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	18
VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
VII. METODOLOGÍA	
1. <i>Modelos animales de ansiedad: EPM y OFT</i>	20
2. <i>Animales</i>	22
3. <i>Protocolos Experimentales</i>	22
4. <i>Análisis de datos</i>	24
VIII. RESULTADOS	
1. <i>Conducta</i>	

1.1 Laberinto elevado en Cruz (EPM)	25
1.2 Prueba de Campo Abierto (OFT)	26
2. Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal.	
2.1. Secreción de Corticosterona	28
2.2. Cambios en los niveles de RNAm de genes de respuesta a estrés en el NPV.	31
2.3 La actividad del Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal y su relación con la conducta de ansiedad.	32
2.4 La actividad del Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal y su relación con la conducta de locomoción.	36
3. Amígdala	
3.1 Cambios en los niveles de RNAm de genes de respuesta a estrés.	37
3.2 Vía TRHérgica	41
2. Efectos de la exploración de los modelos conductuales sobre Eje Hipotálamo Hipófisis Tiroideo	46
IX. DISCUSIÓN	50
X. CONCLUSIONES	56
XI. APÉNDICES	
<u>Apéndice 1.</u> Correlaciones entre elementos que componen al eje HHA en respuesta a la exploración del OFT.	57
<u>Apéndice 2.</u> Correlaciones entre el contenido de TRH en la EM ó TSH y conducta.	58
XII. ANEXO	59
XIII. BIBLIOGRAFÍA	76

RESUMEN

El objetivo central de esta tesis de doctorado fue analizar el papel del TRH amigdalino en conductas de ansiedad. Como los modelos conductuales suponen un estrés para los roedores que innatamente temen a espacios novedosos, abiertos y elevados, un objetivo adicional fue medir la respuesta de estrés. Tomando en cuenta el papel preponderante del TRH en el control del eje Tiroideo y considerando que el estrés por inmovilización inhibe la activación de este eje, el tercer objetivo principal de este trabajo fue caracterizar los posibles efectos de explorar los modelos de laberinto en cruz elevado *EPM* y *OFT* en el eje tiroideo.

Sometimos a ratas macho adultas intactas al *EPM* ó al *OFT* en condiciones de luz (alerta) o de oscuridad (reposo) y las sacrificamos a diferentes tiempos (15, 30 y 60 min posteriores a la prueba conductual) para obtener cinéticas de los posibles cambios fisiológicos resultantes de la exploración de los modelos conductuales. Para cuantificar la respuesta de estrés, se cuantificó la secreción de corticosterona y los niveles de RNAm de CRH, CRH-R1 y GR en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) y en la amígdala. El posible papel del TRH en las conductas de ansiedad se estudió en amígdala, cuantificando el contenido de TRH y analizando cambios en los niveles de expresión del precursor de TRH, sus receptores (TRH-R1 y TRH-R2) y enzima inactivante (PPII). Se realizaron análisis de correlación entre las variables bioquímicas, endócrinas y TRHérgicas con las conductas desplegadas en los modelos de *EPM* y *OFT*.

Todas las condiciones experimentales causaron aumento en la secreción de CORT pero además, el *OFT* causó en el NPV aumento en los niveles de RNAm de CRH (condiciones de oscuridad), de CRH-R1 y disminución en los de GR (experimento realizado en la luz) mientras que en la amígdala disminuyeron los de CRH (luz), CRH-R1 (osc) y los de GR aumentaron en condiciones de oscuridad pero disminuyeron en luz. Los niveles de RNAm de CRH en el NPV también tendieron a aumentar en el *EPM*-luz condición en la que además, y contrario a lo observado en el *OFT*, los niveles de CRH-R1 y GR en la amígdala se incrementaron. El *EPM* explorado en la oscuridad, no causó cambios en los niveles expresión de los genes de respuesta a estrés en el NPV o amígdala. La corticosterona correlacionó con mayor ansiedad sólo en el *EPM* realizado en la luz; en el *OFT* en cambio, correlacionó con locomoción y dependiendo del momento del ciclo luz/oscuridad en que se realizara el experimento. Los niveles de CRH en el PVN del *OFT* en la oscuridad y del *EPM* en la luz correlacionaron con menor ansiedad.

La actividad de las neuronas TRHérgicas amigdalinas fue modulada de manera diferencial en cada modelo y condición. En las ratas sometidas a *EPM* en la oscuridad habíamos reportado una

tendencia a disminuir los niveles del TRH-R1 (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008) en condiciones de luz se modularon negativamente los niveles de RNAm de la PPII y aumentaron los de TRH a los 60 min indicando activación de la vía pero la liberación de péptido en esas mismas muestras, se inhibió. Tanto el contenido de TRH como los niveles de RNAm de TRH correlacionaron con menor ansiedad en ambas condiciones. Aunque la exploración en el EPM no causó cambios en la vía TRHérgica amigdalina que permitan establecer si hubo activación o inhibición, las correlaciones de los elementos TRHérgicos en ambas condiciones con menor ansiedad apoyan el papel ansiolítico del TRH endógeno amigdalino. En el *OFT* realizado en la oscuridad, encontramos aumento en los niveles de expresión de todos los elementos que conforman la vía (receptores, proTRH y PPII) pero la ausencia de cambios en el contenido de péptido indican que no hubo liberación local de TRH en respuesta al modelo. En condiciones de luz, hubo cambios rápidos y transitorios en el contenido de TRH, regulación negativa de los niveles de RNAm de TRH y positiva de los del TRH-R2. Los análisis de correlación indicaron que en la oscuridad, donde no hubo liberación de TRH, la actividad de la vía tendió a correlacionar con menor ansiedad mientras que en condiciones de luz, donde hubo cambios rápidos en contenido de TRH, la actividad de las neuronas TRHérgicas en el modelo de *OFT* correlacionó con mayor locomoción y no se asoció a las conductas de ansiedad.

Estos resultados apoyan lo observado para modelos adversos (Gutiérrez-Mariscal et al. 2008; Thompson y Rosen 2000; Vogel et al., 1980) y aportan nueva evidencia concerniente a modelos que inducen exploración y locomoción. La asociación de la actividad de las neuronas TRHérgicas con menor ansiedad ocurrió en todas las condiciones de manera proporcional al grado de adversidad de las pruebas, siendo más fuerte en el *EPM*. Los resultados de las vías TRHérgica y CRHérgica en la amígdala sugieren una regulación opuesta del estrés sobre estos dos sistemas de comunicación neuronal.

ABSTRACT

Neurons expressing TRH in the amygdala are inhibited after exposure to the defensive burying paradigm (*DBT*) and animals treated centrally with TRH and then submitted to the *DBT* show decreased anxiety and CORT serum concentration with no alteration on locomotion or thyroid status (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). We now studied the regulation of amygdalar TRHergic systems in animals exposed to the elevated plus maze (*EPM*) or open field test (*OFT*) in light or dark conditions. The endocrine response was evaluated by quantifying (radioimmunoassay) serum CORT, TSH and median eminence (ME) TRH content; the stress response by changes in the relative mRNA levels of proCRH, CRH-R1 and GR in PVN and amygdala, by RT-PCR. TRHergic pathway in amygdala was analyzed by quantifying TRH peptide content as well the relative levels of proTRH, its receptors and degrading enzyme (PPII).

All experimental conditions increased CORT levels but only in *EPM*-light they associated with more anxious behavior. In *OFT* tested animals increases in CORT associated inversely with anxiety (light) or proportionally with locomotion (dark). Only in *EPM*-light CRHergic activity in amygdala increased while in *OFT* CRH (light) or CRH-R1 (dark) mRNA levels decreased. These results lead us to conclude the *EPM*-light was the most aversive condition studied and *OFT*-light the least. TRH peptide content in amygdala of *EPM*-light tested animals increased suggesting inhibition of peptide release, but TRH mRNA levels also increased. However, both peptide content and TRH mRNA levels inversely correlated with anxiety. There were rapid and transient peptide content changes in amygdala of *OFT*-light tested animals as well as a decrease in TRH mRNA levels and increase in TRH-R2 mRNA levels. Importantly, TRHergic activity in *OFT*-light tested animals positively correlated with locomotion. No variations were detected in TSH concentrations in any of the conditions studied.

We conclude that exposure to either *EPM* or *OFT* produces activation of the adrenal axis, does not alter thyroid status, and differentially regulate TRHergic neurons in amygdala. The inverse relationship between neuronal TRHergic activity and anxiety seen only in the *EPM* supports this test as anxiogenic with TRH playing an anxiolytic role. Changes in *OFT* were associated to locomotion rather than to anxiety behavior.

I. INTRODUCCIÓN

Esta tesis presenta evidencias sobre la participación del péptido TRH en la conducta de ansiedad estudiada a partir de los modelos conductuales de laberinto en cruz elevado (*EPM*) y campo abierto (*OFT*). Ambos modelos están basados en conductas que en los roedores son innatas y no condicionadas: miedo a ambientes novedosos y rechazo a espacios elevados o abiertos y por lo tanto, su exploración constituye un evento estresante (Pellow et al., 1985; Hall, 1936). Sin embargo, las características de estos modelos permiten que el animal elija evitar las zonas amenazantes en función de su estado emocional y de actividad previo a la prueba. Por lo tanto y a diferencia de otros modelos animales de ansiedad más adversos, el *EPM* y el *OFT* miden *estados basales* de ansiedad y permiten cuantificar además de la ansiedad, conductas de exploración y locomoción.

Se reconoce ahora al estrés como un importante disparador de desórdenes metabólicos, inmunes y psiquiátricos; entre estos últimos la depresión, la ansiedad y el abuso de drogas van en aumento en la sociedad moderna. El tratamiento clínico de estos desórdenes se basa principalmente en drogas ansiolíticas que inciden sobre alguno de los tipos de receptor de GABA, en inhibidores de la recaptura ó de la inactivación de monoaminas. Los efectos secundarios y la latencia al efecto terapéutico de estos tratamientos justifican la búsqueda de nuevos fármacos entre los cuales se encuentran aquéllos que modulan la actividad biológica de los neuropéptidos cuya distribución en cerebro es más restringida (Refojo y Holsboer 2009). Dos péptidos de particular interés son el CRH y el TRH, pues además de controlar la función de los ejes hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y HH-tiroides (HHT) que son importantes moduladores de la respuesta al estrés y metabolismo energético (Watts, 2005; Joseph-Bravo 2004; Turnbull y Rivier, 1997), se sintetizan en regiones del sistema nervioso central (SNC) involucradas en la respuesta de estrés y en las conductas de ansiedad. El CRH presenta propiedades ansiogénicas (revisado en Gallagher et al., 2008) mientras que el TRH, ansiolíticas (Vogel, 1980; Thomson y Rosen, 2000; Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). Estudios farmacológicos con TRH o sus análogos han mostrado efectos benéficos de este péptido como son el efecto antiepiléptico, el antidepresivo, el analéptico y el mnemónico al mejorar la atención y la memoria. Sin embargo, sus efectos son de muy corta duración, poco se conoce sobre los sitios cerebrales involucrados, los efectos dependen del estado de alerta previo del animal y podrían ser modulados por el ciclo circádico (Gary et al., 2003).

El TRH tiene la peculiaridad de ser inactivado por una ectopeptidasa de gran especificidad, la piroglutamato aminopeptidasa II, (PPII) (Charli et al., 2006; Kelly et al., 2000; Charli et al., 1998); la inhibición de esta enzima, que en principio incrementaría los niveles del TRH liberado en las vías activas, representaría por tanto un fármaco de gran utilidad. Ahora bien, para la comprensión de la fisiología de los neuropéptidos se requiere de la caracterización de los eventos involucrados en la regulación de su metabolismo así como la identificación de las vías y regiones cerebrales activadas en respuesta a un estímulo o condición específicos.

Recientemente demostramos que la administración central de TRH reduce la conducta ansiosa en el paradigma de enterramiento defensivo (*ED*) (tesis de maestría), y que las neuronas TRHérgicas de la amígdala muestran una activación que es inversamente proporcional al estado de ansiedad (parte de la tesis doctoral, publicado en: Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). La caracterización del papel de las neuronas TRHérgicas en el sistema límbico y su respuesta a los modelos conductuales de *EPM* y *OFT* representa un problema de interés no sólo para el entendimiento de la fisiología del mamífero sino por sus posibles aplicaciones médicas. En esta tesis se describen los resultados que conciernen los cambios en la vía TRHérgica amigdalina en respuesta a la exploración del *EPM* ó del *OFT* durante las etapas luminosa (reposo) y oscura (alerta) del ciclo luz/oscuridad y se discuten las correlaciones encontradas entre las conductas desplegadas y los elementos que conforman dicha vía.

1. El estrés y la ansiedad

El término “estrés” fue introducido en la literatura científica por el médico de origen eslovaco Hans Selye quien lo definió como “la respuesta *no específica* del cuerpo a cualquier exigencia” (Selye 1950). Aunque con el tiempo se desechó la doctrina de la no-especificidad de la respuesta a estrés (Pacak y Palkovits 2001), los debates sobre la definición de estrés y los circuitos involucrados en función del tipo de estrés, continúan (Goldstein y Kopin 2007). La respuesta de estrés por la exploración de los modelos conductuales de ansiedad es parte indispensable de este proyecto por lo que a continuación se presentan someramente algunas de las definiciones y debates vigentes.

Actualmente, puede definirse al estrés como “una amenaza percibida a la homeostasis donde la respuesta tiene cierto grado de especificidad dependiendo, entre otras cosas, del reto particular a la homeostasis, de la percepción del estresor y de la habilidad de lidiar con él” (revisado en:

Kvetnansky et al., 2009). Otros autores otorgan especial importancia a la constante comparación entre el estado interno del organismo y el reto impuesto por el estímulo estresante “...(el estrés) es la condición en la que la expectación ya sea programada genéticamente, establecida por aprendizajes previos ó deducida por las circunstancias, no corresponde a la percepción actual o anticipada del ambiente interno o externo y dicha discrepancia entre lo que se observa o percibe y lo que se espera o está programado produce patrones de respuestas compensatorias” (revisado en: Goldstein y Kopin, 2007). Sin embargo, las definiciones anteriores dificultan diferenciar las adaptaciones del organismo a eventos cotidianos de las que ocurren ante experiencias excepcionales como abuso o trauma. Por esta razón McEwen y colaboradores han popularizado el concepto de alostasis originalmente propuesto en referencia a los procesos activos por medio de los cuales el cuerpo responde a los eventos diarios y mantiene la homeostasis (Sterling y Eyer, 1988) y propusieron el término de “carga alostática” para referirse al desgaste y daño que resultan ya sea de mucho estrés o de un manejo ineficiente de la alostasis (McEwen y Stellar, 1993). Existen opiniones que desacreditan el uso de los términos propuestos por McEwen y colaboradores al sostener que sólo causan mayor confusión y que sobretodo, no aportan nueva información (Day, 2005; Dallman, 2003).

A pesar de las discrepancias conceptuales, se acepta ampliamente que aumentos en la liberación de adrenalina y noradrenalina de la médula adrenal (activación del sistema nervioso autónomo, SNA), en la liberación central de noradrenalina y/o en la secreción sistémica de glucocorticoides que superen las fluctuaciones circádicas, son marcadores fisiológicos de la respuesta a estrés en los mamíferos (revisado en Goldstein y Kopin, 2007; Sabban y Serova, 2007) (Figura 1). Estas respuestas tienen valor adaptativo y sólo cuando ocurren en ausencia de un estresor o cuando permanecen activadas de manera crónica, ponen en riesgo la sobrevivencia del organismo. En este trabajo nos enfocaremos en la activación del eje HHA y de sistemas CRHérgicos amigdalinos como marcadores de la respuesta a estrés.

Los glucocorticoides son el producto final de la activación del eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HHA) (revisado en: Warne, 2009). La exposición a un estresor provoca aumento de la síntesis en el núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) y liberación en la eminencia media (EM) de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y de arginina-vasopresina (AVP). En la EM estas moléculas mediadoras de estrés son transportadas por el sistema vascular portal hacia la hipófisis anterior en donde actúan en receptores específicos presentes en los corticotropos los cuales secretan la hormona adenocorticotropina (ACTH) a la circulación sistémica. La ACTH en la corteza adrenal promueve la síntesis y liberación de glucocorticoides (corticosterona -CORT- en roedores, cortisol

en humanos). Como en este trabajo estudiamos la respuesta al estrés en modelos animales de ansiedad utilizando a la rata de laboratorio (*Ratus norvegicus*) como sujeto experimental, en adelante nos referiremos a los glucocorticoides como corticosterona (CORT).

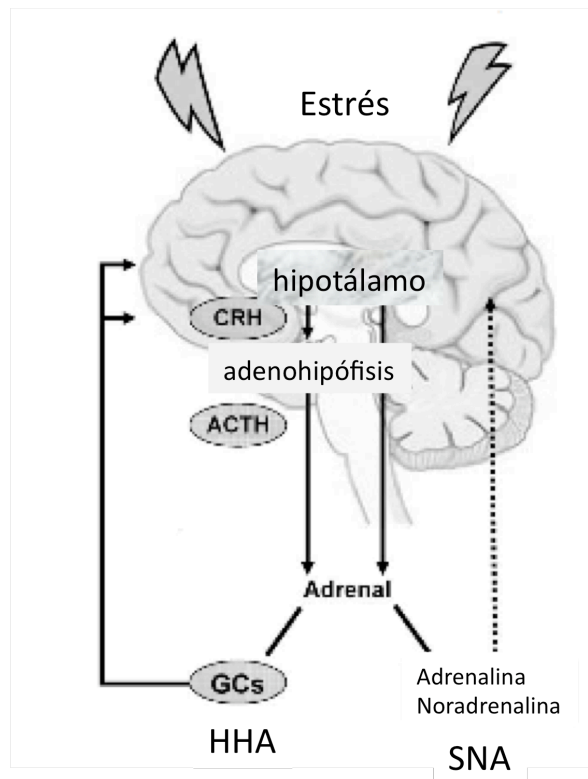


Figura 1. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal HHA y del sistema nervioso autónomo SNA en respuesta a estrés. El estrés estimula la síntesis de CRH en el Hipotálamo (NPV) y su liberación en la adenohipófisis donde provoca la liberación sistémica de corticotropina (ACTH) cuyo blanco es la glándula adrenal. El producto final de la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA) son los glucocorticoides (GCs). El estrés también produce una respuesta del sistema nervioso autónomo (SNA) aumentando la liberación de adrenalina y noradrenalina. Se destaca el papel preponderante del cerebro durante la respuesta de estrés. Tomado de Schwabe 2010.

La actividad del eje HHA está controlada por un sistema complejo de retroalimentación negativa que puede dividirse en tres estadios consecutivos que se distinguen por su temporalidad: retroalimentación rápida, intermedia y lenta (Warne, 2009). La retroalimentación rápida ocurre pocos minutos después del inicio de la respuesta de estrés: la secreción de CRH es inhibida por CORT vía mecanismos no-genómicos que involucran la liberación de endocannabinoides reduciendo mini potenciales post sinápticos glutamatérgicos (excitatorios) en las neuronas CRHérgicas (Di et al., 2003 y 2005). La intermedia inicia alrededor de 30 min después de la exposición al estresor y tiene una duración máxima de 2 hr; inhibe la síntesis y liberación de CRH y ACTH. La retroalimentación lenta ocurre cuando los niveles de CORT se mantienen altos por días o incluso semanas como resultado de estrés crónico o de tratamientos farmacológicos. En esta situación la regulación del HHA es aún más compleja y puede derivar en dos escenarios: habituación o facilitación de la respuesta a estrés (Watts, 2005).

Además del NPV, muchas otras regiones del SNC son responsivas a CORT (NPV, núcleo paraventricular posterior del tálamo, hipocampo, amígdala, etc) y su actividad modula tanto aspectos conductuales de las respuestas a estrés como la actividad del eje HHA (Figura 2). Por ejemplo, la activación del hipocampo en respuesta a estrés tiene un efecto inhibitorio sobre las actividades del eje HHA mientras que la amígdala lo estimula y lesiones del NPV posterior talámico abaten la habituación a estrés por inmovilización crónica (revisado en Warne 2009).

En los mamíferos, se han caracterizado dos receptores para los glucocorticoides, los de tipo I (ó MR porque originalmente se caracterizaron para los mineralocorticoides) y los de tipo II (ó GR). Los MRs tienen alta afinidad por la CORT por lo que en situaciones fisiológicas están unidos a su ligando. En cambio, los GRs tienen una afinidad 10 veces menor a la CORT y en situaciones basales no están saturados, aumentando su ocupación cuando los niveles circulantes se incrementan, como ocurre durante la respuesta a estrés. Los dos tipos de receptores a CORT tienen una distribución diferencial en el cerebro. Los MRs se expresan en altas concentraciones en neuronas de la formación hipocampal y en el septum lateral; en concentraciones moderadas en subnúcleos de la amígdala, el NPV y el locus coeruleus, regiones en donde también se expresa el receptor a CRH, CRH-R1. Los GRs se expresan en todo el SNC pero a mayor concentración en el hipocampo, el NPV y el septum lateral. Ambos receptores se encuentran en el citosol en un complejo multiprotéico con diversas proteínas incluyendo las Hsp90 del cual se liberan al contacto con la hormona y el receptor unido a su ligando es blanco de fosforilaciones específicas que permiten sea traslocado al núcleo donde actúa como factor de transcripción (Jöels y Baram 2009; Grad y Picard 2007).

Ciertos tipos de estímulos estresantes involucran además activación de regiones del SNC conocidas como *Sistema Límbico*, en particular se ha reconocido que durante la ansiedad ocurre activación de sistemas CRHérgicos amigdalinos. La ansiedad es un fenómeno humano emocional común que ocurre en respuesta a estresantes psicológicos o ambientales, en animales se refiere a la ansiedad como respuestas de tipo ansioso, o respuestas de ansiedad pues estrictamente, la ansiedad es un estado emocional humano. La ansiedad es una respuesta adaptativa pues permite el establecimiento de un estado de alerta y consecuentemente, el despliegue de conductas en respuesta al estímulo aversivo (Gross y Hen., 2004), pero resulta patológica al presentarse ante un estímulo que no es nocivo ni amenazante, o incluso sin causa alguna (Clement y Chapoutihier, 1998). Tanto

el miedo como la ansiedad son elementos cruciales de la respuesta conductual y autonómica al estrés y han sido descritas en todos los mamíferos por lo que se consideran mecanismos “universales” de adaptación a condiciones adversas (Gross y Hen, 2004).

Las respuestas de ansiedad ocurren en situaciones de riesgo, los animales despliegan conductas defensivas o de evitación, aumentan su estado de alerta y en ciertos contextos se promueve el aprendizaje de los eventos asociados a la amenaza. La activación de circuitos de ansiedad inhibe conductas que carezcan de valor adaptativo inmediato como la alimentación y las conductas sexuales, enfocando todos los recursos del organismo a la sobrevivencia y aprendizaje del estímulo que causa la ansiedad. Los cambios neuroquímicos que acompañan las respuestas conductuales mencionada se caracterizan por: aumento en la actividad autonómica, aumento del recambio monoaminérgico y en la actividad CRHérgica en regiones límbicas y activación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (Shin y Liberzon 2009; Price y Drevets 2009; Davis et al., 2009; Hartley y Phelps 2009; Jaferi y Bhatnagar, 2007; Merali et al 2003; Muller et al., 2003; Blanchard et al., 2001; Sapolsky et al., 2000).

Uno de los mecanismos neurales por medio del cual los glucocorticoides ejercen sus efectos conductuales durante la ansiedad es la regulación de la expresión de CRH central, sobretodo en la amígdala. El papel preponderante de este péptido en las ansiedad se ha confirmado pues muchos de los efectos conductuales observados durante las respuestas de ansiedad pueden ser evocados al inyectar centralmente CRH, la alteración de la señalización CRHérgica amigdalina por infusiones de agonistas o antagonistas del receptor de CRH-R1 y la sobre expresión de CRH en la amígdala modifican las conductas de tipo ansioso (Revisado en Shepard et al., 2006).

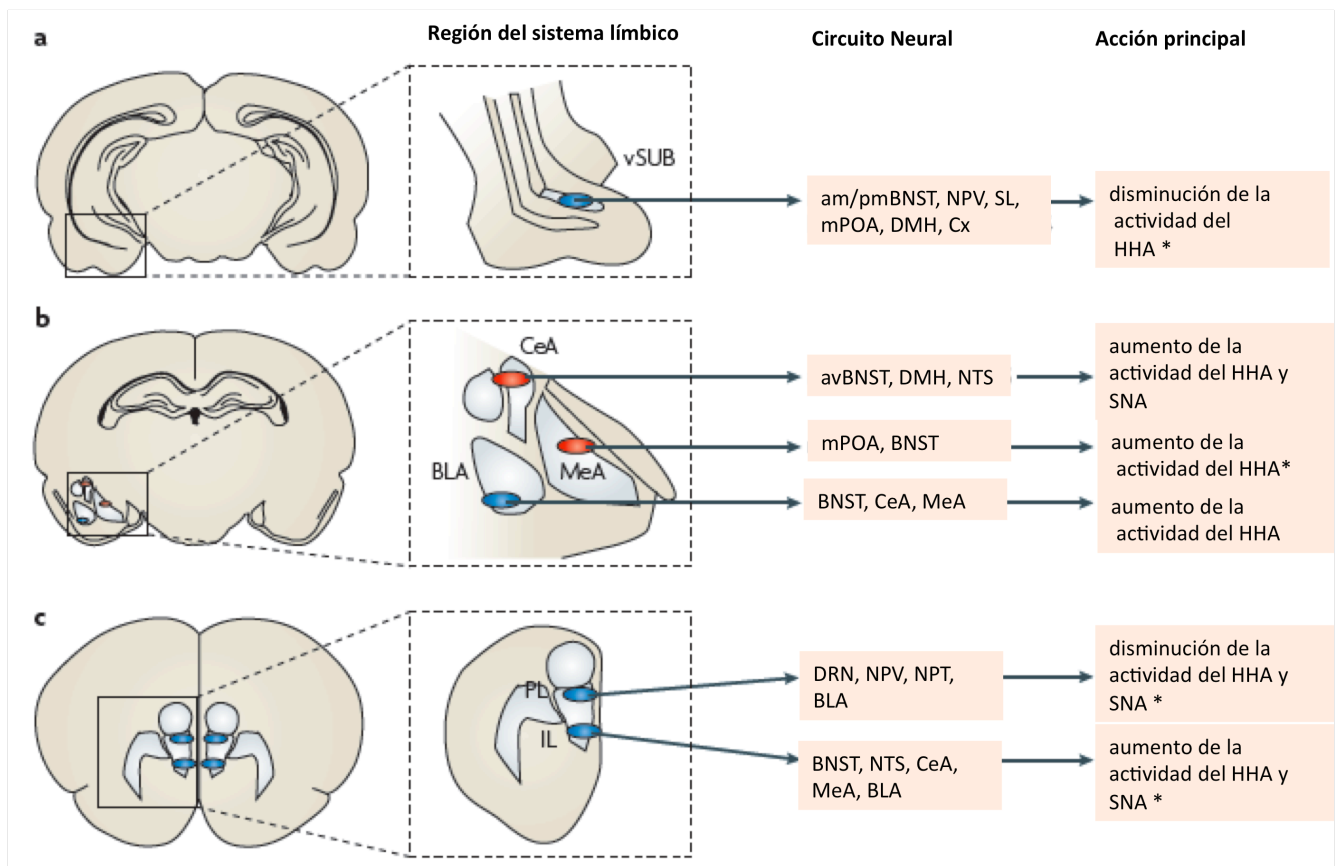


Figura 2. Diagrama de las eferencias del sistema límbico que regulan al eje HHA. **a)** El subículo ventral del hipocampo (vSUB) inhibe la activación del eje adrenal al proveer entradas glutamatérgicas a sitios de relevo del NPV que son predominantemente inhibitorios. **b)** Proyecciones GABAérgicas de la amígdala central (CeA) y medial (MeA) regulan positivamente la respuesta a estrés del HHA mientras que las eferencias de la amígdala basolateral (BLA) son glutamatérgicas. **c)** corteza prelímbica (PL) e infralímbica (IL) regulan diferencialmente la actividad del HHA y del SNA en respuesta a estrés, las proyecciones de la PL involucradas en esta respuesta son glutamatérgicas e inciden sobre sitios de relevo inhibitorios en el NPV. BNST núcleos basales de la estria terminal; NTS núcleo del tracto solitario; DRN núcleo dorsal del Rafé; mPOA área preóptica medial; DMH hipotálamo dorso medial. Tomado de Ulrich-Lai y Herman, 2009.

La ansiedad patológica se puede manifestar en una gran variedad de desórdenes como el estrés post-traumático, las fobias, el trastorno generalizado de ansiedad y trastorno obsesivo-compulsivo que resultan de alteraciones crónicas en los sistemas de respuesta agudos mencionados anteriormente.

Se ha estimado que uno de cada tres mexicanos experimentará al menos un trastorno psiquiátrico en su vida; de éstos, los de ansiedad son el grupo de trastornos con más alta tasa anual de prevalencia, según investigaciones epidemiológicas derivadas de la iniciativa mundial de salud

mental (Organización Mundial de la Salud, ONU) elaboradas por el Instituto Mexicano de Psiquiatría RFM y que representan el primer estudio epidemiológico de desórdenes mentales en nuestro país (Medina Mora et al., 2007 y 2005). En estos índices, México es un país representativo de las tendencias mundiales (Kessler et al., 2005). La alta prevalencia de los desórdenes de ansiedad, su amplia gama y la complejidad de los circuitos involucrados, obligan al desarrollo de modelos animales que permitan identificar los mecanismos que subyacen a las respuestas de ansiedad y a la patología y que resulten en la identificación de terapias farmacológicas exitosas.

2. *Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH)*

La hormona liberadora de tirotropina ó TRH (pGlu-His-Pro) fue el primer *factor liberador hipotalámico* identificado y caracterizado químicamente (Boler *et al.*, 1969 y Burgus et al. 1969). Con su descubrimiento se inició el desarrollo de la neuroendocrinología comprobando el control central (hipotalámico) de la hipófisis que a su vez regula en los mamíferos la actividad reproductiva, alimentaria, metabólica, etc.

El TRH *hipofisiotrópico* es sintetizado en las neuronas parvocelulares del NPV que tienen sus terminales en la EM y se le denomina así por regular la liberación de hormonas en la hipófisis: en respuesta a un estímulo aumenta la síntesis de TRH en el NPV y su liberación en la EM. El blanco del TRH hipofisiotrópico son los tirótrofos de la hipófisis anterior en donde el TRH estimula la síntesis y liberación de tirotropina (TSH) a la circulación sistémica.

La TSH actúa en la glándula tiroides promoviendo la síntesis y liberación de hormonas tiroideas (HT: triyodironina T3 y tetrayodotironina, T4) responsables del metabolismo basal y en respuesta a retos metabólicos (figura 3). El TRH tiene también como blanco los lactotrofos donde regula la síntesis y liberación de prolactina.

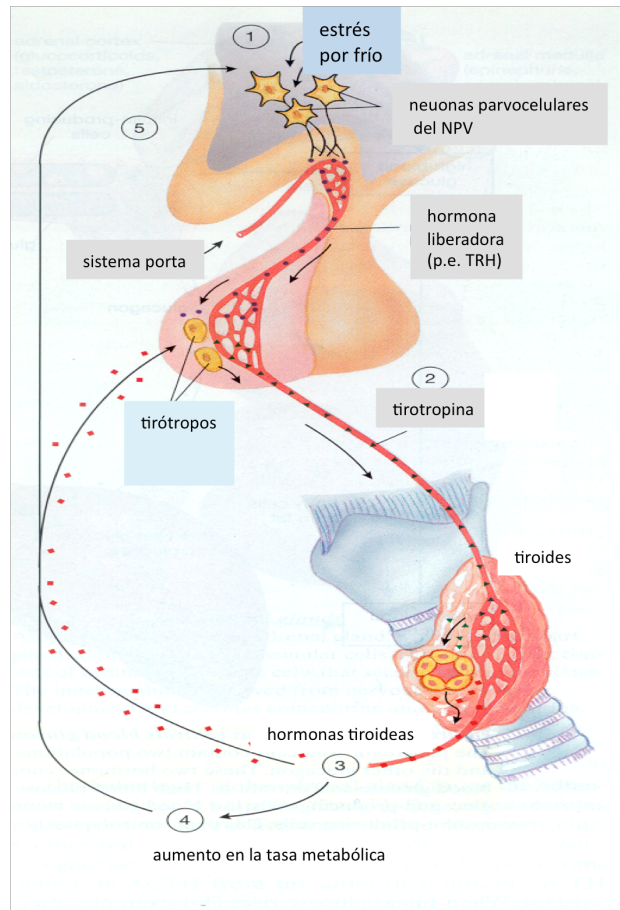


Figura 3. Activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) por un estímulo de estrés por frío. 1. Estimulación de la síntesis de TRH por el estímulo estresante en las neuronas del NPV. 2. liberación de la adenohipófisis de tirotrópina. 3 y 4. Aumento en la liberación de hormonas tiroideas al torrente sanguíneo. 5. Regulación de la activación del eje por retroalimentación negativa.

3. El eje Tiroideo y el estrés

El eje HHT se activa en situaciones de cambios en la demanda energética del organismo, como durante la exposición a estrés agudo por frío ó durante el ejercicio. La actividad del eje puede ser modulada por otros tipos de estrés por ejemplo, el estrés por inmovilización causa una inhibición (Cizza et al 1996). La inmovilización tanto aguda como crónica disminuyen los niveles circulantes de TSH y de hormonas tiroideas, y los niveles de RNAm de TRH en el NPV. Se ha postulado que la activación del sistema NA/CRH inducido por el estrés puede causar el efecto inhibitorio sobre la síntesis de TRH a través de aferencias CRHérgicas en el NPV. El aumento en la actividad CRHérgica influiría también en la disminución de la liberación de TSH al modificar la actividad de neuronas de somatostatina, que tienen un efecto inhibitorio sobre la TSH, en el NPV cuyas terminales nerviosas inciden en la EM. Por el papel preponderante del TRH en la regulación del eje tiroideo y porque se ha reportado que el estrés por inmovilización lo inhibe, en este trabajo

averiguaremos si la exploración de los modelos conductuales de *EPM* y *OFT* causan cambios en la actividad del HHT (Cizza et al., 1996).

4. El TRH del SNC

Además de las funciones neuroendócrinas, se ha propuesto que el TRH es un neuromodulador en el SNC (Gary *et al.*, 2003; Prokai 2002; Horita, 1998). Existen evidencias neuroanatómicas y farmacológicas que apoyan esta hipótesis. Los elementos que conforman la vía de transmisión TRHérgica son el precursor del péptido (proTRH), sus dos receptores específicos (TRH-R1 y TRH-R2), y la ectoenzima membranal que degrada al TRH una vez liberado en el espacio sináptico, la piroglutamato aminopeptidasa II (PPII). Estas moléculas están distribuidas en forma heterogénea en todo el SNC, apoyando la participación de circuitos centrales TRHérgicos en procesos neurales no relacionados a la función endócrina.

Por ejemplo, en la amígdala se ha reportado RNAm de TRH en los núcleos basolateral (BLA) y corticomedia posterior; en el primero se localiza además RNAm del receptor R2 y en el segundo, del R1 y de la PPII. En el núcleo central de la amígdala, donde se encuentran altas concentraciones del RNAm de CRH (Revisado en Davis et al., 2009), se observan terminales nerviosas con inmunoreactividad positiva al TRH y se localizan los RNAm de ambos receptores aunque en baja intensidad (menor del TRHR1) y de la PPII pero no se detecta RNAm de TRH (Hökfelt *et al.*, 1989; Heuer *et al.*, 2000).

La distribución amplia y heterogénea de los elementos que conforman el sistema TRHérgico apoya la propuesta de que el TRH funciona como neurotransmisor en el SNC. También existen evidencias farmacológicas que sugieren efectos del TRH y/o análogos independientes de la función neuroendócrina (Prokai, 2002). El TRH ha sido propuesto como un activador neuronal ya que cuando es administrado, sistémica o centralmente, aumenta el tiempo de vigilia (Arnold *et al.*, 1991), disminuye el tiempo de la narcosis inducida por β -endorfinas (Taché *et al.*, 1977), tetrahidrocanabinol (Bhargava y Matwyshyn, 1980), benzodiazepinas (Glue *et al.*, 1992), barbitúricos (Hashimoto *et al.*, 1993; Sharp *et al.*, 1984,) y por etanol, así como los efectos hipotérmicos causados por éste (French *et al.*, 1993; Breese *et al.*, 1974). Las evidencias indican que el TRH activa la vía GABAérgica y compite con el sitio de unión a las benzodiazepinas en el receptor ionotrópico GABA_A, lo que ha sido demostrado en la espina dorsal (Fleming y Todd, 1994).

El TRH provoca mejoras en medidas conductuales de memoria y aprendizaje que involucra los sistemas colinérgico y noradrenérgico, siendo el TRH un facilitador de estas vías (Ogasawara *et al.*, 1996; Itoh *et al.*, 1994a y b; Kasparov y Chizh, 1992). El TRH aumenta la actividad de la vía colinérgica en los sistemas septo-hipocampal y núcleo basal-cortical (Giovannini *et al.*, 1991).

Cuando es inyectado al núcleo accumbens (Sharp *et al.*, 1984; Miyamoto y Nagawa, 1977), área ventral tegmental, caudado (Kalivas *et al.*, 1987), núcleos septales (Sharp *et al.*, 1984) o al hipotálamo ventromedial (Shian *et al.*, 1985), el TRH promueve la activación del sistema locomotor. Se propone que estos efectos son principalmente mediados por el sistema dopaminérgico (Miyamoto y Nagawa, 1977); la liberación de dopamina en el núcleo accumbens puede observarse incluso después de una inyección sistémica de TRH (Heal y Green, 1979).

Los experimentos de reversión del estado de sedación causado por drogas fueron extendidos al utilizar animales en estado de sedación natural, como ocurre durante los períodos de hibernación. En estos animales el TRH inyectado en el hipocampo dorsal restablece la actividad general del animal (Stanton *et al.*, 1981 y 1992) pero si el péptido se inyecta en animales conscientes, los efectos son inhibidores. Estos fueron los primeros trabajos en los que se propuso que los efectos del TRH son estado-dependientes y que su inyección provoca el restablecimiento de la homeostasis del organismo (Gary *et al.*, 2003).

De estas evidencias se desprenden dos conclusiones importantes. Primero, que el TRH puede actuar como neuromodulador de otros sistemas de neurotransmisión, ya sea potenciándolos (como en el caso de la acetilcolina en neuronas corticales; Giovannini, *et al.* 1991) o antagonizándolos (como en los efectos de reversión de la sedación y de la narcosis inducida por diversas sustancias). En segundo lugar, que los efectos de la administración exógena de TRH dependen del estado previo del organismo. Esta visión provee un marco conceptual que reconcilia la gran variedad de efectos del TRH en el SNC (Gary *et al.*, 2003).

En resumen, existen evidencias anatómicas y funcionales que fundamentan el papel neuromodulador del TRH en el SNC, independiente de sus funciones neuroendócrinas y que está involucrado en la expresión de determinadas conductas y/o en la decodificación de estímulos estresantes. Sin embargo, la función del TRH no-neuroendócrino ha sido inferida por medio de administración exógena de TRH, o sus análogos, y poco se sabe sobre la participación de las vías TRHérgicas endógenas en las conductas observadas.

5. Regulación de la transmisión TRHérgica, estudios a partir de la célula neuroendócrina.

Todos los elementos que participan en la transmisión TRHérgica son susceptibles a regulación: la síntesis y liberación del propio TRH, de sus receptores y de su enzima inactivante, pueden ocurrir en forma rápida y de manera tejido-específica. En el sistema neuroendócrino por ejemplo, es posible medir la respuesta rápida ante un estímulo a nivel central en las células orquestadoras de la respuesta endócrina localizadas en el NPV y la consecuencia de dicha activación, en las células blanco donde se produce y libera la hormona. En el caso del eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides (HHT), una estimulación neuronal como es el frío, incrementa en pocos minutos la síntesis de TRH en el NPV, causa en segundos la liberación de TRH al sistema vascular portal y en minutos la de TSH de la pituitaria (Joseph-Bravo, 2004; Joseph Bravo et al. 1998). Por medio de estudios en células de hipófisis en cultivo, se ha evidenciado que la actividad y expresión del receptor TRH-R1 están reguladas por TRH; el 80 % del complejo receptor-TRH se internaliza después de 5 min de incubación con el TRH y además, la degradación del RNAm de TRH-R1 se incrementa por activación directa de RNAsas (desde los 10 min presentando un pico máximo a los 30) lo cual ocurre a través de la fosforilación por PKC de una proteína reguladora del sistema de RNAsas; a tiempos largos de incubación, el TRH aumenta los niveles de RNAm del receptor.

El TRH inhibe también la actividad y los niveles de RNAm de la PPII en cultivo de hipófisis (Charli, et al. 2006 y 1998). Tanto para los receptores como para la PPII se ha observado, *in vitro* e *in vivo*, regulación heteróloga: las hormonas tiroideas disminuyen el número de receptores en hipófisis así como los niveles de RNAm (Yamada M, et al 1992; DeLéan A, et al., 1976) mientras que incrementan la actividad y RNAm de la PPII. Los estrógenos en cambio, aumentan la expresión del receptor TRH-R1 en hipófisis, consistente con el papel del TRH en la liberación de prolactina (Fink et al., 1993). La regulación homóloga de los receptores de TRH en el SNC no ha sido demostrada. Estas evidencias permiten inferir activación de neuronas TRHérgicas cuando aumentan los niveles del RNAm; indican que cuando el TRH se une a su receptor este complejo se internaliza rápidamente y se promueve la degradación del RNAm del receptor mientras que si el TRH se encuentra presente por largos periodos de tiempo, promueve un aumento en su síntesis y que la expresión y actividad de la PPII también son modulados negativamente por el TRH.

El TRH, como todos los neuropéptidos, es sintetizado en el soma neuronal como un precursor de alto peso molecular que es compartamentalizado en el retículo endoplásmico junto

con enzimas procesadoras en gránulos de secreción y procesado en su viaje a la terminal nerviosa. Se ha estimado que este proceso dura al menos 60 min (Harthoorn et al., 2002; Cheong et al., 2002). Hasta el momento, medir la liberación del TRH en el SNC no es posible debido a la baja sensibilidad del radioinmunoensayo (RIA) (20 pg) lo que obligaría a coleccionar por tiempos largos, complicando la interpretación de los resultados. Sin embargo, el contenido de TRH evaluado en distintas regiones cerebrales es la resultante de eventos de liberación y de síntesis. Es importante resaltar que debido a su compartimentalización, las peptidasas solubles no degradan al TRH intracelular (Charli et al. 1998) por lo que a tiempos cortos (de hasta 60 min) un cambio en el contenido de TRH no refleja cambios en la síntesis sino en la liberación del péptido maduro. Sin embargo, como ocurre en el caso del RNAm de CRH en el NPV o de CRH maduro en la EM, existe un almacén considerable de TRH maduro en la EM (Hökfelt et al., 1989), por lo que en ocasiones es difícil detectar cambios en el contenido de TRH en esta región .

6. Regulación de la transmisión TRHérgica en el Sistema Nervioso Central

Los primeros estudios que midieron cambios extrahipotalámicos de la actividad de las neuronas TRHérgicas, utilizaron paradigmas de estimulación transináptica como la producida por estimulación eléctrica subumbral de la amígdala “*kindling*”. Este paradigma detecta activación de circuitos neuronales y permitió demostrar que incrementos en los niveles de RNAm de TRH y del péptido, específicamente en las regiones epileptogénicas (hipocampo, amígdala y corteza frontal), ocurren de manera proporcional al aumento de la frecuencia de descarga y concomitantemente, la expresión y actividad de la PPII disminuyen así como la de sus receptores (De Gortari P. et al., 2006 y 1995; Kubek et al., 1993; Rosen et al., 1992). Posteriormente se definió que drogas de abuso como el alcohol causan también cambios en la expresión del péptido y sus receptores en regiones blanco de estas drogas (de Gortari et al., 2005 y 2000; Jaworska-Feil et al 1997). La inducción química de la degeneración de eferentes serotoninérgicas del núcleo de rafé a la médula espinal, donde co-localizan TRH y serotonina, aumenta, a tiempos largos, el número de receptores de TRH en médula, puente y cerebro medio (Sharif et al., 1983 y 1989) y aumenta la actividad de la PPII (Joseph-Bravo et al., 1994).

Estos hallazgos han permitido establecer que la activación de las neuronas TRHérgicas modula negativamente la expresión de sus receptores y de la PPII en la célula postsináptica en el SNC mientras que la inhibición de la señal peptidérgica los regula positivamente. Las evidencias moleculares mencionadas validan el estudio de la actividad de las vías TRHérgicas centrales por

medio del monitoreo de los niveles de expresión de los elementos involucrados en la transmisión TRHérgica (expresión de proTRH, de receptores y de PPII) en forma similar a la determinación de la expresión de c-fos u otros genes tempranos como índice de activación neuronal (Kovács, 2008).

II. ANTECEDENTES

1. Estudios sobre la función de circuitos TRHérgicos centrales

Con el objetivo de establecer la función de los circuitos TRHérgicos centrales, se han utilizado paradigmas conductuales en los que relacionan cambios en el contenido de TRH en regiones cerebrales con determinadas conductas. Sattin y colaboradores (1999), utilizando el modelo de nado forzado de Porsolt, establecieron cambios en contenido de TRH en regiones involucradas en la conducta de depresión como la corteza, el hipocampo y el estriado. Sin embargo, era difícil relacionar dichos cambios a un aumento o disminución en la actividad neuronal debido a que los animales eran sacrificados a tiempos largos después de la prueba por lo que no era posible distinguir entre un efecto de síntesis y uno de liberación.

Nuestro laboratorio ha sido uno de los primeros en analizar cómo están regulados los elementos que involucran la transmisión TRHérgica en modelos conductuales. Basados en los cambios encontrados en los paradigmas de *kindling* y de administración aguda ó crónica de etanol, que afectan principalmente estructuras como el hipocampo y la corteza, el primer modelo conductual estudiado fue el de aprendizaje espacial (laberinto de Morris “*MWM*”). Se midió, además del contenido TRH en diversas regiones del SNC, los niveles de expresión del proTRH, de los receptores TRH-R1 y TRH-R2 y de la PPII así como su actividad. Los niveles de RNAm de TRH en el hipocampo aumentaron específicamente en las ratas que aprendieron a encontrar la plataforma y correlacionaron directamente con el marcador conductual de aprendizaje (Aguilar-Valles et al., 2007). Los experimentos realizados con el paradigma de aprendizaje espacial (laberinto de Morris “*MWM*”) evidenciaron efectos no específicos de la prueba sobre la actividad de las neuronas amigdalinas en donde el contenido de TRH disminuyó y los niveles de RNAm de proTRH aumentaron. En esas mismas muestras, la actividad de las neuronas CRHérgicas estuvo inhibida (aún cuando los niveles de CORT estaban incrementados) y la de BDNF aumentada (Aguilar-Valles et al 2005 y 2007). Al ser el CRH un péptido ansiogénico (revisado en Heinrichs y Koob, 2004; Schulkin et al., 1998) cuyos niveles de RNAm en la amígdala aumentan por CORT y durante el estrés por inmovilización (revisado en Bakshi and Kalin, 2000; Makino et al., 2002) y, basados en la función ansiolítica del BDNF (Koponen et al., 2004), de TRH (Thompson and Rosen, 2000; Vogel et al., 1980), y de un péptido críptico derivado del precursor pro-TRH (PPTRH 178–199) (McGivern et al., 1997), se hipotetizó que situaciones que demandan atención para desplegar determinadas conductas, pueden causar una inhibición de vías ansiogénicas por la activación

simultánea de sistemas neuronales antagónicos; en este caso, TRH y BDNF suprimirían la acción ansiogénica de CRH (Aguilar-Valles A, et al., 2005 y 2007).

2. El TRH amigdalino y la conducta de ansiedad

La participación de las neuronas TRHérgicas amigdalinas en las conductas de ansiedad fue evaluada directamente utilizando el modelo de Enterramiento Defensivo (“ED” Treit et al., 1981) y el modelo de EPM, ambos realizados durante la fase activa del ciclo:luz oscuridad de las ratas, manteniendo así las mismas condiciones que en los experimentos de aprendizaje espacial. Se cuantificó la expresión génica de TRH, y de los elementos involucrados en su transmisión en animales sometidos al ED. El efecto ansiolítico del TRH fue estudiado inyectando TRH i.c.v y sometiendo a los animales a ED posteriormente (20 min). La publicación se encuentra en el anexo I (Gutiérrez-Mariscal et al. 2008) y a continuación haré un breve resumen.

La inyección intra-cerebro ventricular (icv) de TRH disminuyó el marcador conductual de ansiedad (tiempo de enterramiento del electrodo) en comparación con el grupo que recibió solución salina; también disminuyó la CORT sérica mientras que las hormonas tiroideas no cambiaron, apoyando así un efecto directo del TRH sobre el SNC. Estos hallazgos confirmaron el efecto ansiolítico que si bien había sido previamente reportado en el paradigma de sobresalto acústico, los autores no pudieron discernir entre el efecto ansiolítico y el de un aumento en el estado de alerta (Thompson y Rosen 2000). Nosotros analizamos además, en ratas intactas, el contenido de TRH maduro por radioinmunoensayo (RIA) y los niveles de su RNAm , de los receptores 1 y 2 (TRH-R1 y TRH-R2), y los de la PPII en el NPV-EM y en la amígdala. Encontramos que las ratas más ansiosas tuvieron disminuida la síntesis y liberación de TRH en la amígdala sugiriendo que un blanco del efecto ansiolítico del TRH exógeno pudiera ser esta región. Reforzamos estas hipótesis usando el modelo del laberinto en cruz elevado (“EPM”) también realizado durante la fase oscura del ciclo, en donde la actividad de las neuronas TRHérgicas de la amígdala se asoció negativamente con las conductas de ansiedad.

En resumen, en el trabajo publicado (Gutiérrez-Mariscal et al. 2008) demostramos que la conducta de ansiedad es inversamente proporcional a la actividad de las neuronas TRHérgicas de la amígdala en los modelos de ED y en el EPM cuando estos paradigmas fueron realizados en el periodo de actividad de los animales.

III. JUSTIFICACIÓN

La respuesta conductual ante un estresor depende de muchos factores, entre los que se encuentran el tipo de estresor y el estado de alerta del animal. La prueba de *ED* administra choques eléctricos que si bien no causan daño tisular sí representan un componente adverso causando ansiedad que se manifiesta por la conducta defensiva de enterramiento (lanzar aserrín para enterrar el electrodo con movimientos rápidos de las extremidades superiores) (Treit et al., 1981). En cambio, los estímulos adversos de los modelos de *EPM* y *OFT* son los espacios abiertos y elevados y la novedad (Choleris, E. et al., 2001; Carobrez y Bertoglio, 2005). La exploración de estos modelos permite el despliegue de conductas en función del estado de alerta y de la emocionalidad del sujeto experimental. Contrario al *ED*, se considera que el *EPM* y el *OFT* no causan ansiedad sino que miden estados de ansiedad detectando la elección de cada sujeto experimental de evitar o explorar las zonas adversas (Choleris, et al. 2001; Rodgers et al., 1997). Por lo tanto, si en los modelos de *EPM* y *OFT* observamos cambios en la transmisión TRHérgica amigdalina parecidos a los reportados en el *ED*, se podrá asociar la participación del TRH de esta región con aspectos generales de la ansiedad y no sólo con un tipo de estrategia conductual particular a un modelo específico.

Como se mencionó, el TRH tiene efectos en el despertar y/o el estado de alerta (arousal), su expresión y liberación están regulados durante el ciclo circadiano (Covarrubias et al., 1994 y 1988), y los efectos conductuales de su administración pueden depender del estado del animal (revisado en: Gary, 2003; Prokai, 2002; Horita, 1998) por lo que algunos de los cambios encontrados en los estudios de *ED* y *EPM* en la oscuridad, pudieran relacionarse con el la etapa del ciclo luz:oscuridad en que se realizara la prueba conductual. En este trabajo analizamos si los modelos de *EPM* en la luz (reposo) y *OFT* en condiciones de oscuridad (alerta) ó de luz afectan la transmisión TRHérgica en la amígdala de la misma manera que lo observado para el modelo de *ED* y *EPM* en la oscuridad.

Caracterizar la respuesta de estrés a nivel sistémico (secreción de corticosterona) y central (regulación de genes de respuesta a estrés en NPV y amígdala) permitirá averiguar la magnitud de la activación del eje adrenal, sus posibles asociaciones con la conducta de ansiedad y los probables efectos sobre la transmisión TRHérgica central, aportando nueva información sobre las complejas interacciones que ocurren durante la ansiedad.

El TRH del NPV tiene un papel preponderante sobre la regulación del eje tiroideo (Joseph-Bravo, 2004), que regula el metabolismo durante cambios en la demanda energética. El ejercicio producido por el *MWM* (Aguilar-Valles et al., 2007) indujo aumento en la concentración sérica de

TSH pero la experiencia del *ED* ó del *EPM* realizados en la oscuridad la mantuvo en concentraciones basales (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). El *EPM* en condiciones de luz y en particular el *OFT* que propician la locomoción por la exploración de ambientes novedosos pueden aumentar la demanda energética y activar el eje tiroideo. Sin embargo, el componente novedoso también activaría el eje adrenal que ha sido reportado como inhibidor del tiroideo. Averiguar la concentración sérica de TSH y los niveles relativos del RNAm de TRH y TRH-R1 en el NPV en respuesta a la experiencia de *EPM* y *OFT* pueden ayudar a comprender la interacción de los ejes tiroideo y adrenal durante el estrés.

IV. HIPÓTESIS

En el modelo de *ED* la vía TRHérgica amigdalina se inhibe y la administración central de TRH exógeno disminuye específicamente el marcador conductual de ansiedad (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). El uso de modelos animales de ansiedad como el *EPM* y el *OFT* que no exponen al animal a un estímulo adverso inescapable permitirá distinguir la actividad del TRH amigdalino que participa en estados de ansiedad a las de locomoción o aumento en la atención. Los protocolos conductuales se llevarán a cabo en ambas fases del ciclo luz/oscuridad lo que permitirá comparar los efectos del ciclo circádico y del estado de alerta del animal previo a las pruebas en la actividad de las neuronas TRHérgicas amigdalinas y en las respuestas de los ejes adrenal y tiroideo.

V. OBJETIVOS

Objetivo Central

Analizar la participación del TRH amigdalino en la conducta de ansiedad evocada por los modelos de laberinto en cruz elevada (EPM) y campo abierto (OFT) en condiciones de luz y de oscuridad.

Objetivos Específicos

Establecer la magnitud y duración de la respuesta de estrés causada por la exploración de los modelos conductuales y analizar su relación con las conductas desplegadas.

Evaluar si la exploración de los modelos conductuales afecta la actividad del eje tiroideo y si ésta se relaciona con las conductas evocadas por los modelos conductuales.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Ratas macho adultas intactas serán sometidas a EPM ú OFT en la fase luminosa y oscura del ciclo luz/oscuridad y sacrificados a diferentes tiempos después de realizada la prueba (15, 30 y 60 min). La actividad de las neuronas TRHérgicas en amígdala será evaluada midiendo el contenido de TRH y los niveles de RNAm de TRH, TRH-1, TRH-R2 y PPII. Por medio de análisis de correlación se analizará si los elementos que conforman la vía TRHérgica amigdalina, se asocian a alguna conducta desplegada por los animales que exploraron los modelos conductuales en cada condición experimental.

Se analizará la respuesta de estrés causada por la exploración de los modelos conductuales evaluando la actividad del eje adrenal y de vías relacionadas a ansiedad en amígdala. Se cuantificará por radioinmunoensayo (RIA) la concentración de corticosterona (CORT) en suero y se analizarán, por medio del método transcripción reversa seguida por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), los niveles de RNAm de CRH, CRH-R1 y GR en NPV y en amígdala.

El estado de activación del eje tiroideo será analizado cuantificando por RIA la concentración de TSH en suero y el contenido de TRH en la EM y por RTPCR los niveles de expresión del RNAm de TRH y del TRH-R1, en el NPV.

En esta tesis se incluirán de los resultados publicados, únicamente aquéllos que conciernen a la prueba del laberinto en cruz en condiciones de oscuridad pues serán comparados con los más recientes efectuados en condiciones de luz. En la sección de resultados, se discutirán puntualmente los relacionados a los ejes adrenal y tiroideo para dejar en la sección de discusión aquellos relacionados sólo al objetivo central de esta tesis.

VII. METODOLOGÍA

1. Modelos animales de ansiedad

El modelo del Laberinto en Cruz Elevado (*EPM*) (Pellow et al., 1985) se basa en producir conflicto entre el deseo innato de los roedores por explorar ambientes novedosos y su natural aversión a los espacios abiertos. Se utiliza una estructura en forma de cruz, que se encuentra a 70 cm del suelo. Los 4 brazos que componen el laberinto tienen las mismas dimensiones (50 x 10 cm) pero dos de ellos tienen paredes altas y son denominados brazos cerrados (BC), los otros dos no tienen paredes y son denominados brazos abiertos (BA). El *EPM* es uno de los modelos de ansiedad no-condicionados más utilizado y ha sido extensamente validado farmacológicamente y etológicamente (Liebsch et al. 1998). Se cuantifica el número de entradas a los BA y el tiempo que los animales permanecen en éstos (expresados generalmente como porcentaje relativo al número de entradas a y el tiempo total de permanencia en ambos tipos de brazos) y estos números se asocian en forma inversa a la ansiedad (a mayor número menor la ansiedad). La locomoción se cuantifica como la suma de entradas a ambos brazos y la distancia recorrida en los BC. (Rodgers y Dalvi, 1997; Rodgers et al., 1997; Carobrez y Bertoglio, 2005). El nivel de respuesta de cada animal durante la exploración del *EPM* depende del estado basal de ansiedad (Rodgers et al. 1997; Wigger y Neumann 1999) y por lo tanto, este modelo evalúa más que conductas ansiosas, “estados de ansiedad”.

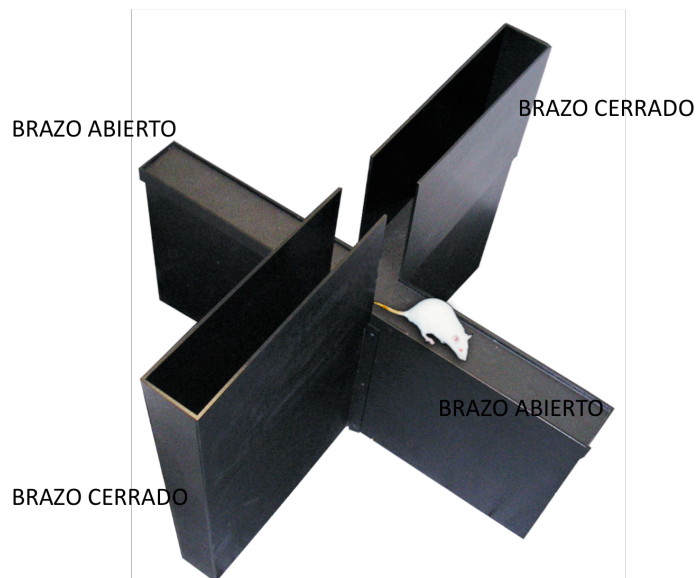


Figura 1. Imagen del *EPM* que fue utilizado durante estos experimentos.

La prueba de campo abierto (“*OFT*” del inglés: *open field test*) (Hall, CS. 1936) mide la actividad motora de un animal en un ambiente novedoso, característica que constituye un estrés (van den Buuse, et al., 2002) pero el aparato en sí no resulta adverso, a menos que se modifique con este propósito (cambios en la intensidad luminosa, objetos u olores novedosos/adversos, etc) lo cual no se hizo en este trabajo. El aparato o “arena” consiste en un cuadrado de 1 m x 1 m con paredes de 70 cm de altura en donde los animales son colocados (en el centro) y se compara el tiempo, la velocidad y la distancia en el centro y en la periferia (Eilam, 2003; Choleris, et al 2001; Prut y Belzung 2003). Se considera que un animal está más ansioso cuanto menos tiempo permanezca en el centro del campo abierto. El *OFT* también permite medir locomoción que se expresa como la distancia recorrida en la zona periférica del cuadrante.

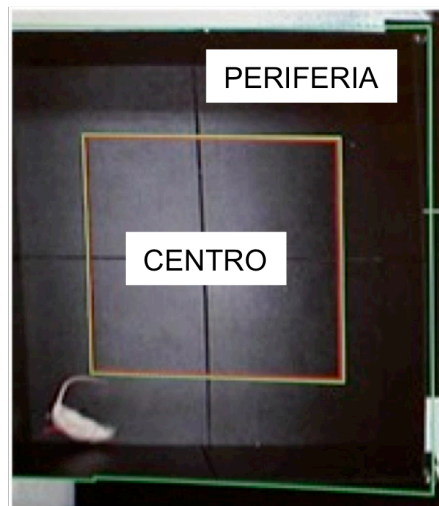


Figura 2. Fotografía aérea del OFT. La imagen fue obtenida de la computadora de análisis conductual durante la estandarización de protocolos. Se muestra a la rata en la periferia del campo abierto.

Ambos modelos tienen la ventaja de que las respuestas conductuales son parte del repertorio innato de los roedores (explorar nuevos ambientes, temer espacios abiertos y/o elevados). Por lo tanto, no se requieren sesiones de entrenamiento, ni la incorporación de premios o castigos que condicionen la respuesta y que involucren otros circuitos cerebrales, además de los que participan en las conductas de ansiedad. Los modelos de *EPM* y *OFT* permiten así cuantificar conductas de tipo ansioso que dependerán del estado basal de ansiedad/alerta del animal.

En este trabajo se presentan resultados de al menos dos experimentos independientes con el *EPM* ó con el *OFT* realizados durante el periodo de reposo ó de actividad de los animales (durante la fase luminosa y de oscuridad, respectivamente). Como se mencionó, los resultados del *EPM*

realizado durante la fase activa del ciclo han sido previamente reportados (Gutiérrez-Mariscal et al. 2008) pero, se hará referencia a ellos a lo largo de esta tesis con fines de comparación.

2. Animales

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 3 a 3.5 meses de edad al día del experimento. Los animales fueron criados en el bioterio del Instituto de Biotecnología (UNAM, Campus Morelos) y a los 2 meses de edad fueron transferidos a la sección del bioterio que pertenece al Laboratorio de Neurobiología donde sólo personal autorizado y entrenado en el manejo de animales en estudios conductuales les cambiaba la caja y el agua cada tercer día. La temperatura (20-22 ° C) y humedad son controladas automáticamente y monitoreadas constantemente.

3. Protocolos Experimentales

El Instituto de Biotecnología (UNAM, campus Morelos) cuenta con un bioterio en el que se reproducen y crían las ratas utilizadas en este trabajo las cuales son entregadas aproximadamente a los 2 meses de edad; se cambian entonces al cuarto de estancia de ratas experimentales (1 y 2), cercano al de producción, donde permanecen al menos 3 semanas antes del experimento, en grupos de 3/ caja (23 x 47 x 20 cm) con acceso a alimento (Harlan 2018S) y agua *ad libitum*. Nuestro espacio en el bioterio está dividido en cuatro salas: cuarto de procedimientos, cuarto de conducta y dos cuartos donde se mantienen las ratas experimentales (cuidamos de tener cada género en cuarto independiente). Cada cuarto está aislado en cuanto a olores y ruidos del resto. El cuarto de conducta y el cuarto(1), tienen control de luces independiente de los otros cuartos. Para los experimentos realizados en la fase de oscuridad (*EPM*, dos experimentos independientes N=12 y N=13 6-7/gpo y *OFT* N=42, 6-11/gpo), tres semanas antes del experimento, los animales fueron colocados en el cuarto 1 fijando las luces con ciclo luz/osc invertido (luces encendidas a las 1900h). Para los experimentos en la fase de luz (*EPM*, dos experimentos independientes N=30 y N=35, 6-19/gpo y *OFT* N=50, 6-11/gpo), los animales permanecieron al menos un mes antes de cualquier manipulación, en el cuarto 2 donde las luces se encendían a las 0700h. Todos los experimentos se realizaron entre las 1000 y las 1200 h.

El día del experimento, los animales fueron transferidos individualmente al cuarto de conducta donde se les colocó en el centro del *EPM* o del *OFT* y se les permitió la exploración por 5

min. La conducta se analizó utilizando el software SMART y mediante la video-grabación con una cámara (Sony) colocada en el techo, centrando el aparato. En el experimento de *OFT* en condiciones de luz, la conducta se monitoreó usando ambos sistemas de análisis conductual. Una vez transcurridos los 5 min de exploración en el *EPM* o en el *OFT*, los animales fueron regresados al cuarto de estancia: al de luces invertidas, si el experimento era en la oscuridad, ó al de luces no invertidas, si el experimento era en la luz, en lo que transcurría el tiempo de sacrificio. Se hicieron 3 grupos experimentales con tiempos de sacrificio de 15, 30 o 60 min después de la exploración en los aparatos conductuales y en cada intervalo se sacrificó un grupo de ratas intactas (CI). Con excepción de los experimentos EPM-osc donde no hubo grupo de tiempo de sacrificio de 60 min.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación en un cuarto independiente de los de estancia o el de conducta; se obtuvo sangre troncal, se extrajeron los cerebros teniendo cuidado de cortar el nervio óptico antes de sacarlo y, una vez extirpado, se disecó el hipotálamo mediobasal conteniendo parte del n. arcuato y la eminencia media (EM) colocándolo en tubos individuales en hielo seco; el cerebro se colocó sobre las cortezas cerebrales en hielo seco. La sangre fue almacenada a 4°C, centrifugada (3000 rpm, 25 min, 4°C) para separar el suero en alícuotas que se utilizaron para radioinmunoensayos (RIAs) de tirotrópina (TSH) y corticosterona (CORT). Los cerebros y las EMs, se almacenaron a -80 °C hasta su disección.

Los cerebros se disecaron con navaja siguiendo las coordenadas de un atlas de microdisección (Palkovits y Brownstein, 1988). Se realizaron cortes coronales con bisturí y navaja de disección obteniendo rebanadas a partir de las cuales se disecaron con sacabocados los núcleo paraventriculares del hipotálamo NPV (de la rebanada P1500µm-P2100, sacabocados de 0.5 mm de diámetro) y las amígdalas (P1500µm-P2100µm y P2100µm-P3300µm, sacabocados de 1 mm de diámetro). Los dos núcleos paraventriculares (NPV) que se encuentran mediales, se obtuvieron y guardaron en un mismo tubo mientras las secciones derecha e izquierda de las amígdalas se almacenaron por separado. Las disecciones de los hemisferios izquierdos y las EMs se utilizaron para realizar RIA de TRH y las derechas junto con los NPV, para extraer RNA total, retro-transcribir y realizar reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) de los genes de interés en cada región.

4. *Análisis de datos*

Los resultados fueron calculados como % de la media del grupo control intacto (CI) de cada experimento y el conjunto analizado estadísticamente por medio de análisis de varianza de una vía, consideradas significativas cuando la $F > 1$ y la $p < 0.05$ se utilizó la prueba post hoc de Fisher para distinguir las diferencias entre los grupos (significativas también cuando $p < 0.05$). Para el estudio de correlaciones se realizaron análisis de regresión simple entre variables conductuales y bioquímicas que se consideraron significativas cuando $r > |0.65|$ y $p < 0.05$.

VIII. RESULTADOS

1. Conducta

La conducta de ratas macho adultas intactas de la cepa Wistar en el laberinto en cruz elevado (*EPM*) ó el campo abierto (*OFT*) fue analizada durante la fase oscura y durante la fase luminosa del ciclo iniciando en ambos casos 3h después del cambio de fase. Los animales permanecieron por 5 minutos en el aparato conductual sin haber sido manipulados previamente.

1.1 Laberinto elevado en Cruz (*EPM*)

Los animales que exploraron el *EPM* entraron y pasaron más tiempo en los brazos cerrados (Gutiérrez Mariscal et al., 2008 y Tabla 1) que en los abiertos, independientemente si los animales y el estudio se realizaba en la etapa de luz ó la de oscuridad. La conducta de locomoción, que se mide cuantificando el número total de entradas a los brazos abiertos y cerrados y por el tiempo que los animales pasan en los brazos cerrados, tampoco fue distinta en las 2 condiciones experimentales estudiadas. Los resultados indican que el estado de alerta previo a la prueba no modificó la conducta de ansiedad en el *EPM* (figura 1) ni las medidas de locomoción.

CONDUCTA EPM	OSC	LUZ
% tiempo en BA	33.8. ± 9.4	37 ± 3
% entradas a BA	33.3 ± 8	39 ± 3
# entradas totales	14 ± 1	16 ± 1
Tiempo en BC	70 ± 12	93 ± 15

Tabla 1. Conducta en el *EPM* de ratas sometidas al paradigma durante la fase oscura (OSC) y luminosa (LUZ) del ciclo.

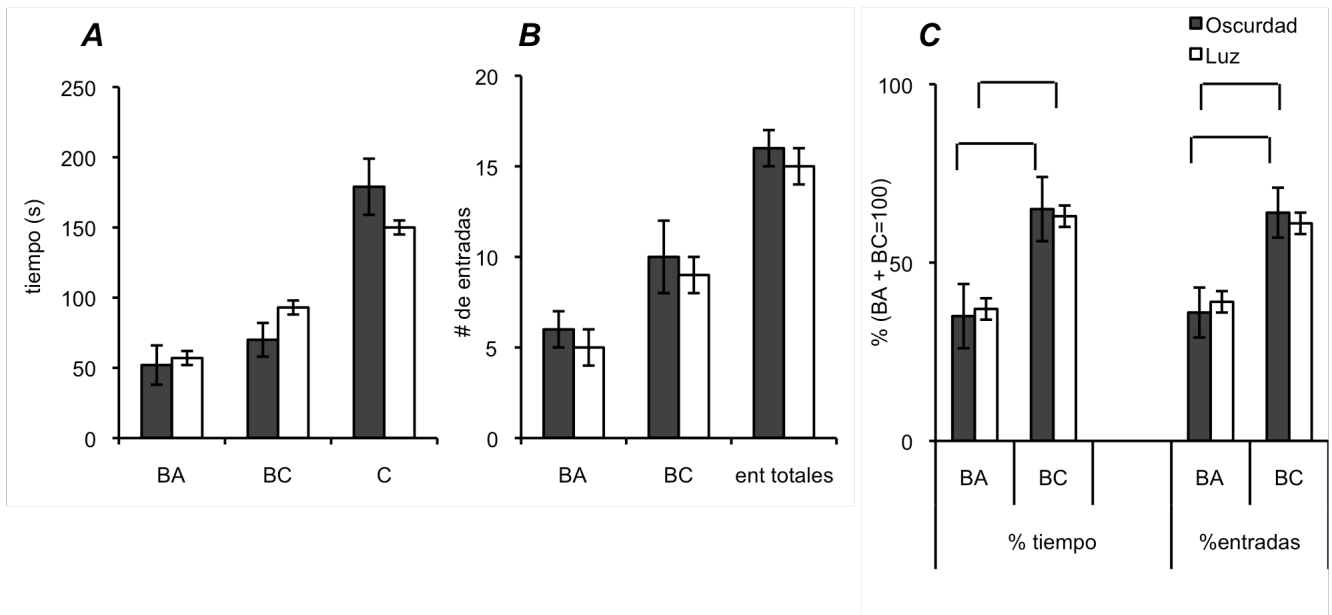


Figura 1. Análisis conductual en el laberinto en cruz elevado (*EPM*) en condiciones de oscuridad (barras sólidas) y de luz (barras blancas). **A)** Tiempo en segundos. **B)** Número de entradas promedio en las zonas del *EPM*. **C)** Parámetros de ansiedad: promedio de porcentaje de tiempo y entradas ($\%BA = BA / (BA + BC) \times 100$). Las diferencias significativas ($p < 0.05$) están indicadas por corchetes. BA: brazos abiertos, BC: brazos cerrados y C: centro.

1.2 Prueba de Campo Abierto (*OFT*)

Los animales que exploraron el *OFT* estuvieron más tiempo y recorrieron más distancia a menor velocidad en la periferia que en el centro de la arena (Fig. 2) tanto en condiciones de luz como de oscuridad. Al igual que en el *EPM*, la conducta de ansiedad en el *OFT* y, los parámetros de locomoción (distancia recorrida en la periferia), fueron independientes del estado de alerta previo del animal o de la condición luz/oscuridad (Tabla 2).

CONDUCTA EN EL <i>OFT</i>	Oscuridad (SMART)	Luz (SMART)	Luz (manual)
Tiempo (s)			
Centro	29 ± 4	38 ± 4	27 ± 3
Periferia	271 ± 4	262 ± 4	271 ± 3
Distancia (m)			* #
Centro	7.8 ± 0.9	7.6 ± 0.7	crucés 5.63
Periferia	47.4 ± 2.5	52.2 ± 2.5	± 0.6 66 ± 4

Tabla 2. Conducta en el *OFT* ratas macho adultas sometidas al paradigma durante la fase oscura (alerta) y luminosa (reposo) del ciclo. La conducta fue analizada con el software SMART ó manualmente utilizando la videograbación del experimento (MANUAL). No hubo diferencias en el tiempo o distancia recorrida en el centro o periferia del *OFT*. No existen diferencias entre los parámetros conductuales si se analiza la conducta manualmente o por medio del sistema computarizado SMART.

Estos resultados indican que el miedo a espacios abiertos y elevados (*EPM*) ó novedosos y abiertos (*OFT*) no es regulado por el estado de alerta. La implicación biológica de la conducta observada en ambos modelos resulta evidente si consideramos que un animal requiere desplegar conductas que lo lleven a evitar zonas de riesgo independientemente del estado de alerta en que se encuentre en ese momento. Además de las conductas de tipo ansioso, los dos modelos animales utilizados en este trabajo permiten evaluar conductas de locomoción y exploración. En nuestros resultados tampoco hubo una diferencia en dichos parámetros si los animales eran sometidos a la prueba conductual en su periodo de actividad o en el de reposo.

Si bien la conducta en promedio fué igual en ambas condiciones y coincide con lo reportado: mayor tiempo en los brazos cerrados en el *EPM* (Carobrez y Bertoglio, 2005), y mayor tiempo en la periferia del *OFT* (Eilam, 2003), las respuestas fisiológicas al estrés de la prueba y los marcadores de actividad de las neuronas TRHérgicas fueron reguladas diferencialmente.

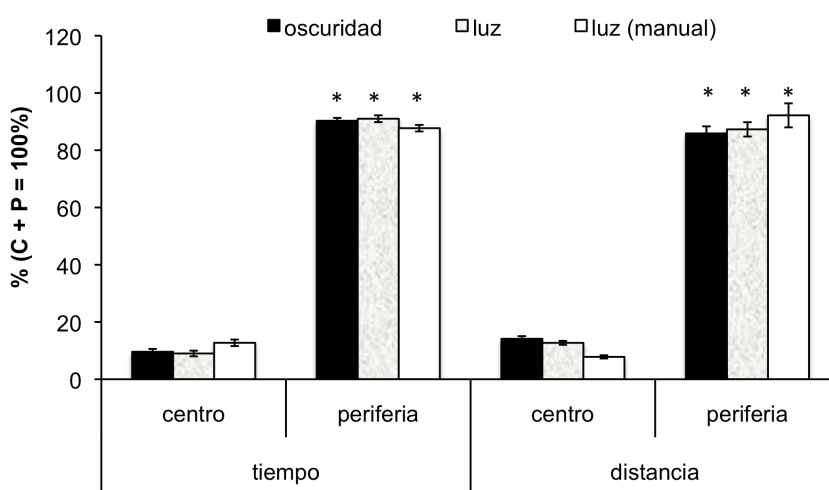


Figura 2. Conducta en la prueba de campo abierto (*OFT*) en condiciones de oscuridad (barras sólidas) y en condiciones de luz (barras con textura y blancas). El análisis de la conducta fue realizado con el software smart (barras sólidas y con textura) y manualmente (barras blancas) *diferencia significativa ($p < 0.05$)

2. Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal.

2.1. Secreción de Corticosterona

La liberación de corticosterona (CORT) al torrente sanguíneo refleja la activación del eje adrenal en respuesta a la exposición a un estresor. En estos experimentos medimos la concentración sérica de CORT tanto en estado basal (grupos control intacto, CI) como en respuesta a la exploración de los modelos conductuales y los cambios relativos de los niveles de RNAm de moléculas mediadoras de la respuesta a estrés: proCRH, CRH-R1 y GR en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), núcleo orquestador de la regulación del eje adrenal.

Analizamos si la respuesta era distinta en función del modelo conductual (*EPM/OFT*) y si variaba en magnitud o duración dependiendo de las condiciones de luz/oscuridad en que los animales fueran expuestos a las pruebas. Para medir la temporalidad de los cambios bioquímicos, los animales fueron sacrificados a los 15, 30 y 60 min después de cada prueba.

La concentración de CORT en estado basal (grupos controles intactos CI) de ratas en el periodo de actividad (oscuridad) fue mayor que la de las ratas sacrificadas durante la fase de reposo (luz) (Tabla 3) coincidente con reportes previos (Kalsbeek et al., 2005; Lu et al., 2002; D'Agostino et al., 1982). Los niveles basales de las ratas control del experimento *OFT* en la oscuridad, fueron mayores que los de las ratas en esta misma fase pero del experimento de *EPM* (Tabla 3).

CORTICOSTERONA	<i>EPM</i>		<i>OFT</i>	
	OSC	LUZ	OSC	LUZ
CI(ng/ml)	299 ± 30*	204 ± 60	391 ± 29*,&	142 ± 37

Tabla 3. Concentración sérica basal de corticosterona en cada grupo control intacto de los experimentos realizados. Se expresa la media ± el error estándar (esm) de cada grupo control intacto (CI). *diferencia osc vs luz de mismo protocolo conductual $p < 0.05$; &diferencia *OFT*-osc vs *EPM*-osc $p < 0.05$.

Explorar el *EPM*, ó el *OFT*, causó un aumento en la liberación de CORT en ambas condiciones experimentales (luz y oscuridad). La magnitud y duración de esta respuesta variaron

dependiendo del modelo (*EPM/OFT*) y del momento del ciclo (luz/oscuridad) en que los animales fueron sometidos a los protocolos (Fig. 3).

Los animales que exploraron el *EPM* en condiciones de luz tuvieron mayor concentración de CORT sérica que los grupos controles, a los tres tiempos medidos ($F_{3, 49} = 5.9$, $p = 0.002$) (Fig. 3A), mientras que los animales sometidos a *OFT*, sólo en los grupos de 15 y 30 min ($F_{5,40} = 29.2$, $p < 0.0001$) (Fig. 3B). Sin embargo, la magnitud de la respuesta de CORT a tiempos cortos (15 min post-test) fue mucho mayor en el *OFT* (aumentó hasta $774 \pm 42\%$, vs. $CI = 100 \pm 29\%$) que en el *EPM* ($357 \pm 6\%$ vs $CI = 100 \pm 12.5\%$).

Cuando los protocolos conductuales fueron realizados en la oscuridad, la CORT en ratas que exploraron el *EPM* aumentó a los 15 y 30 min (Fig. 3C) ($F_{2, 21} = 10.8$, $p < 0.0006$ y resultados publicados en Gutiérrez-Mariscal et al., 2008, no hay grupo de 60 min); y el *OFT* aumentó a los tres tiempos medidos (Fig. 3D) ($F_{4, 37} = 15.3$, $p < 0.0001$). La magnitud de la secreción de CORT a tiempos cortos (grupos de 15 min) después de la exploración del *OFT* ó *EPM* en condiciones de oscuridad no fue significativamente diferente. El grupo control del experimento *OFT* en la oscuridad presentó mayor concentración de CORT que el grupo control del experimento *EPM*-osc (Tabla 3), lo que no impidió que en respuesta a la exploración del *OFT* la secreción de CORT aumentara.

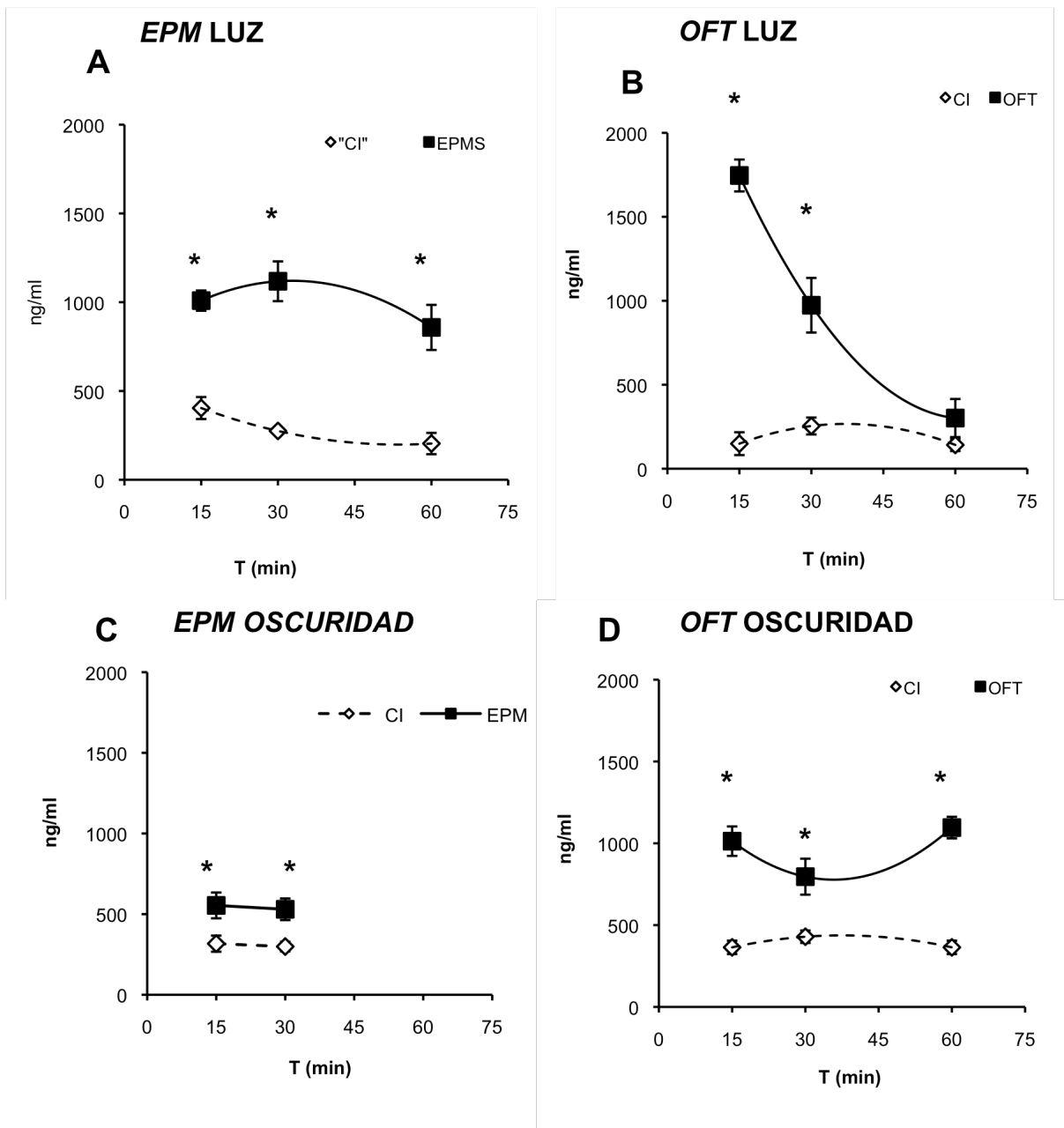


Figura 3. Concentración de CORT en animales sometidos a las pruebas conductuales (cuadros negros) de *EPM* y *OFT* en la etapa luminosa del ciclo (**A** y **B**) y en la de oscuridad (**C** y **D**). Los niveles basales de corticosterona (grupos controles intactos, CI) se indican en rombos blancos. Los valores están expresados en ng/ml y representan el promedio \pm esm de cada grupo ($n=6-19/gpo$). *ANOVA y prueba post hoc de Fisher indicando diferencia significativa ($p<0.05$) respecto a CI.

2.2. Cambios en los niveles de RNAm de genes de respuesta a estrés en el NPV

El aumento de la liberación sistémica de CORT es el producto final de la activación del eje HHA en respuesta a un estresor pero la activación de este eje inicia con la estimulación de las neuronas CRHérgicas del NPV del hipotálamo, provocando el aumento en la síntesis de CRH y del receptor CRH-R1 que también son sujetos a regulación por CORT (Makino et al. 2002, Karandrea et al., 2000; de Kloet et al, 2005). Medimos los niveles relativos del RNAm del CRH, de su receptor CRH-R1 y los del receptor a glucocorticoides (GR) en el NPV en respuesta a exploración en el *EPM* y *OFT*. A estos genes les llamaremos en adelante genes de respuesta a estrés (Tabla 4).

<i>HHA</i>	<i>EPM</i>		<i>OFT</i>	
	OSC	LUZ	OSC	LUZ
CRH				
CI	100 ± 9	100 ± 10	100 ± 11	100 ± 6
15`		150 ± 36 *	157 ± 34 *	95 ± 10
30`	114 ± 10	91 ± 8	151 ± 26 *	112 ± 6
60`		99 ± 12	89 ± 18	114 ± 12
CRH-R1				
CI	100 ± 6	100 ± 21	100 ± 17	100 ± 12
15`		118 ± 19	80 ± 38	159 ± 16*
30`	77 ± 8	118 ± 31	182 ± 22*	67 ± 9
60`		121 ± 8	61 ± 13	127 ± 17
GR				
CI	100 ± 5	100 ±	100 ± 16	100 ± 13
15`		123 ± 22	150 ± 37	112 ± 3
30`	131 ± 15	126 ± 13	147 ± 23	48 ± 4*
60`		122 ± 8	94 ± 12	87 ± 8

Tabla 4. Cambios en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés en el NPV de ratas sometidas a *EPM* u *OFT* en la fase de luz y oscuridad. +tendencias (diferencias significativas sólo por la

prueba de t de student vs CI) y *cambios significativos (cuyas ANOVAS $F > 1.0$ y $p < 0.05$). En gris se muestran resultados ya publicados en Gutiérrez-Mariscal et al., 2008.

Los niveles de RNAm de CRH en el NPV tendieron a aumentar en las ratas sometidas al *EPM* en condiciones luminosas ($F_{3,34}=3.2$, $p=0.04$, prueba post hoc de Fisher, $p = 0.056$) en el grupo sacrificado 15 min después de concluida la exploración en el *EPM*. En esas condiciones, no hubo cambios en la expresión de CRH-R1 ni GR. En las ratas sometidas a *OFT*, en condiciones de luz, no encontramos cambios significativos en los niveles de RNAm de CRH pero los de CRH-R1 aumentaron a los 15 min ($F_{5, 40}= 3.3$, $p = 0.02$) y los de GR disminuyeron a los 30 min post test ($F_{5, 40}= 3.9$, $p < 0.0001$) (tabla 4).

Los niveles de RNAm de los genes de respuesta a estrés en ratas sometidas al *EPM* en condiciones de oscuridad no cambiaron (Tabla 4 y Gutiérrez-Mariscal et al., 2008), mientras que en las ratas sometidas al *OFT* en la etapa de oscuridad, los niveles de RNAm de CRH tendieron a aumentar (CRH: $F_{5, 41}= 2.39$, $p = 0.054$) y los de CRH-R1 aumentaron significativamente ($F_{5, 40}= 4.6$, $p = 0.002$).

*En conjunto los resultados de esta sección indican que en respuesta a la exploración de los modelos conductuales hay activación del eje adrenal evidenciada por aumento en CORT. Los animales tuvieron un incremento en la concentración sérica de CORT en respuesta a la exploración en los modelos conductuales aún cuando, debido a fluctuaciones circádicas, los niveles basales estaban elevados en los experimentos realizados durante la fase oscura. El análisis de la expresión de los genes de respuesta a estrés en el NPV indican que el protocolo de *OFT* produce una activación integral del eje HHA: aumento en CRH, en CRH-R1 (en ambas condiciones) y disminución en GR. En cambio, en el *EPM* sólo hubo aumento en CORT y en CRH en condiciones de luz.*

2.3 La actividad del Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal y su relación con la conducta de ansiedad.

La magnitud y duración de la secreción de CORT y los cambios en la expresión de los genes de respuesta a estrés fue diferente en cada modelo y condición experimental. Como los efectos de los glucocorticoides en el SNC y la conducta son dosis-dependientes y varían en función de los niveles basales circulantes, analizamos la asociación entre las conductas de ansiedad en cada

modelo, la concentración de CORT y los niveles de expresión de los genes de respuesta a estrés en el NPV.

Si bien las correlaciones entre conducta y parámetros bioquímicos no implican una relación causa-efecto, sugieren modulaciones coordinadas ó interacciones específicas y son una herramienta que ayuda a interpretar las diferencias en las respuestas fisiológicas al estrés observadas de un modelo a otro. Es importante aclarar que una falta de correlación no necesariamente implica que no exista una relación entre variables ya que puede ser debido a limitaciones técnicas. Por ejemplo, los cambios en niveles de corticosterona sérica son más rápidos (pico a los 10-15 min de iniciada la prueba) que los cambios que pueden medirse en los niveles de expresión génica donde el RNAm que supera los niveles basales se detecta a partir de los 30 min.

En el *EPM* realizado en la luz, la conducta de ansiedad correlacionó positivamente con la secreción de CORT e inversamente con los niveles de CRH en el NPV (Figs. 4A y 4B). Estas asociaciones indican que en el *EPM*-luz, la actividad del eje adrenal correlaciona con la conducta de ansiedad; los niveles bajos de CRH en el NPV de las ratas más ansiosas evidencian posibles eventos de regulación negativa de altos niveles de CORT sobre la activación del eje adrenal.

La activación del eje adrenal en respuesta a la exploración del *EPM* en condiciones de oscuridad sólo se evidenció por el aumento en secreción de CORT que no correlacionó con la conducta de ansiedad (Fig. 4C). Probablemente, exista un efecto del estado de alerta aumentado en las ratas que exploraron el *EPM* en condiciones de oscuridad que no permita la asociación directa entre la conducta de ansiedad y la activación del eje adrenal. Otra opción es que la activación del eje en esas condiciones se asocie a otras conductas y no a las de ansiedad. Los niveles de GR en el NPV se asociaron en forma de U con el porcentaje de entradas a los brazos abiertos (Fig. 4D). El comportamiento en forma de U se ha observado en el efecto de glucocorticoides en varias conductas (Roozendaal 2009; Conrad et al., 1999) evidenciando que estas hormonas son requeridas para un funcionamiento adecuado del SNC pero, en concentraciones altas pueden tener efectos deleterios. El GR es un blanco de retroalimentación de los glucocorticoides cuya expresión a su vez es modulada por estimulación neuronal (Lightman, 2008); el tipo de asociación en U con la conducta pudiera ser reflejo de esta modulación multifactorial por lo que sería muy especulativo intentar hacer mayores explicaciones.

En el *OFT* la secreción de CORT no se asoció significativamente con la conducta de ansiedad si bien en condiciones de luz, hubo una tendencia ($p=0.07$) entre el tiempo en el centro del campo abierto y la concentración de CORT (Fig. 4E). En condiciones de oscuridad, los niveles de

CRH en el NPV se asociaron positivamente con la distancia recorrida en el centro de la arena del *OFT* (Fig. 4F). Esta relación indica que los animales más ansiosos (menos distancia recorrida en el centro) tuvieron menores niveles de CRH y apoya la encontrada en el *EPM* (luz) donde la expresión de CRH en el NPV fue proporcional a menor ansiedad. Los niveles de RNAm de GR en el *OFT* no se asociaron con las conductas de ansiedad en ninguna de las dos condiciones experimentales.

El análisis entre las variables bioquímicas mostró una asociación positiva en *OFT*-luz entre la expresión de CRH y la de CRH-R1 ($r = 0.95$, $p < 0.0001$) ó la concentración de CORT ($r = 0.73$, $p = 0.007$) (ver gráficas en el Apéndice 1) indicando que en estos animales mientras mayor la expresión de CRH, mayor la secreción de CORT y los niveles de CRH-R1. Se evidencian eventos de regulación positiva entre los elementos que conforman el eje adrenal (células CRHérgicas del NPV y CORT) por la exploración del *OFT* en condiciones de luz. En el experimento realizado en la oscuridad la correlación de CRH con CORT se invirtió ($r = -0.81$, $p = 0.0003$); CORT correlacionó negativamente con los niveles de RNAm de CRH-R1 ($r = -0.81$, $p = 0.0005$) y CRH correlacionó positivamente con CRH-R1 ($r = 0.95$, $p < 0.0001$). Las correlaciones negativas sugieren una regulación del eje adrenal por retroalimentación negativa debido probablemente a los altos niveles basales encontrados en *OFT*-osc y apoyan el mecanismo de regulación negativa que permite mantener al sistema trabajando dentro de cierto umbral (Aguilera et al., 2007).

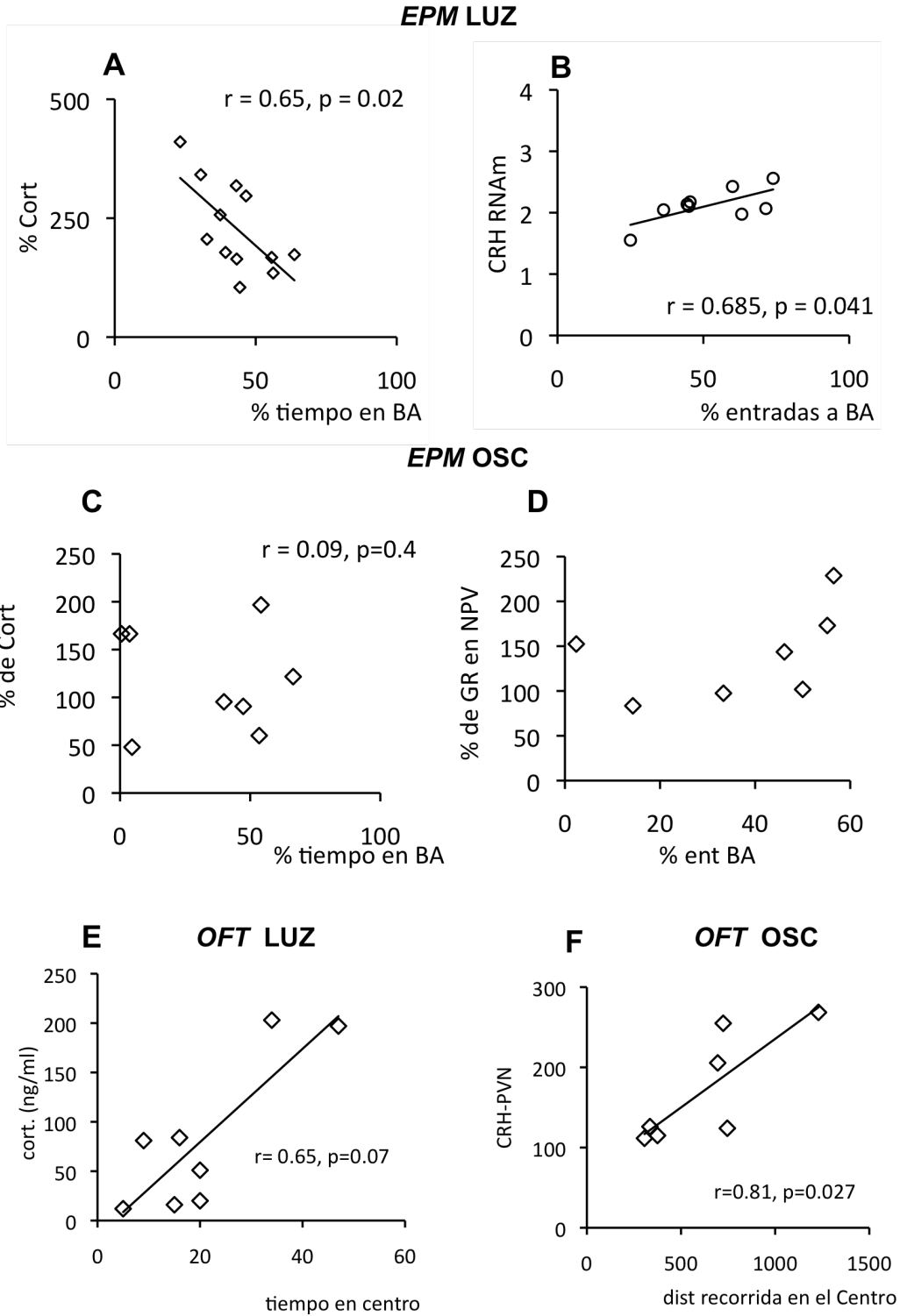


Figura 4. Correlaciones entre la conducta de ansiedad y la actividad del eje adrenal en ratas sometidas a *EPM* y *OFT* en condiciones de luz y oscuridad. En el *EPM* luz, mayor ansiedad correlacionó con más [CORT]. Se indica en cada gráfica el coeficiente de correlación “r” que es significativo cuando > 0.6 y $p < 0.05$.

2.4 La actividad del Eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal y su relación con la conducta de locomoción

Ya que sólo en el *EPM* realizado en la luz se evidenció que la actividad del eje adrenal en respuesta al modelo conductual se asoció a mayor ansiedad y, los modelos de *EPM* y *OFT* permiten cuantificar no sólo los estados basales de ansiedad sino también el grado de locomoción, analizamos si esta última conducta correlacionaba con la expresión de los elementos que componen al eje adrenal. Encontramos correlaciones significativas en los animales que exploraron el *OFT* en ambas condiciones. En el *OFT*-luz, hubo una asociación inversa entre la conducta de locomoción y la concentración de *CORT* (Fig. 5A) sugiriendo un efecto negativo de *CORT* (o del estrés) en la exploración. En contraste, en el *OFT*-osc hubo asociación positiva entre la conducta de exploración (distancia recorrida en la periferia) y la concentración sérica de *CORT*: las ratas con mayor locomoción fueron las que secretaron más *CORT* (Fig. 5B).

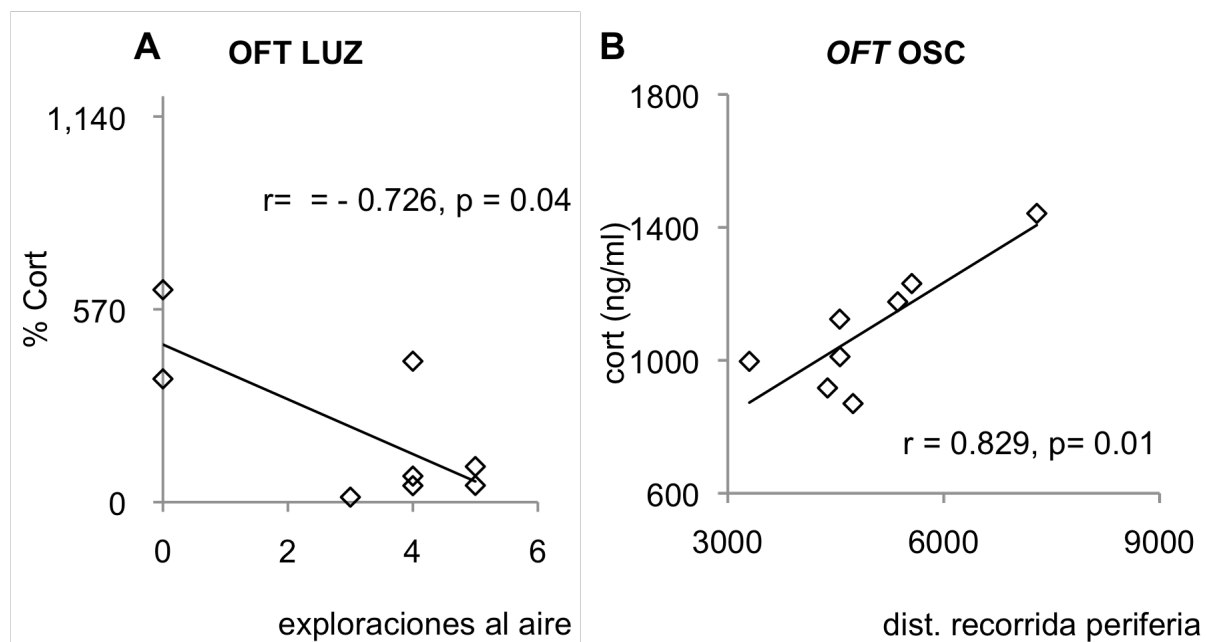


Figura 5. Correlaciones entre la conductas de locomoción y la actividad del eje adrenal en ratas sometidas a OFT en condiciones de luz (A) y oscuridad (B). En condiciones de oscuridad, las ratas más activas en el OFT secretaron más *CORT*. Se indica en cada gráfica el coeficiente de correlación “r” que es significativo cuando > 0.6 y $p < 0.05$

En conjunto, las correlaciones entre las conductas de ansiedad y locomoción con CORT sugieren que la activación del eje adrenal es proporcional a la conducta de ansiedad en el EPM luz y a la de locomoción en el OFT osc. En el EPM realizado en la oscuridad, la activación del eje adrenal no se asoció directamente a ninguna conducta mientras que en el OFT-luz, la activación del eje fue inversa tanto a la conducta de ansiedad como a la de locomoción.

3. Amígdala

3.1 Cambios en los niveles de RNAm de genes de respuesta a estrés

Se presentan primero los resultados del perfil de expresión de genes de respuesta a estrés en la amígdala para poder establecer qué modelo (*EPM* u *OFT*), y qué condición (luz/osc), estimula más vías características de ansiedad. Nuestro diseño experimental permite hacer comparaciones entre condiciones y modelos pues en todos los casos, las ratas no fueron manipuladas previamente y las condiciones experimentales son las mismas. La “jerarquización” de la respuesta a la situación adversa de cada modelo establece un marco conceptual que facilitará la interpretación de los resultados de la siguiente sección (vía TRHérgica amigdalina).

Debido a que modelos de estrés por inmovilización, aumentan los niveles de RNAm de CRH en la amígdala (revisado en Bakshi and Kalin, 2000; Makino et al., 2002) se determinaron los cambios en los niveles de RNAm de CRH en esta estructura así como los del receptor de CRH tipo 1 (CRH-R1) reportado como un marcador de ansiedad y que, en ciertos modelos, parece ser más sensible que el CRH (Merali et al., 2004; Jasnow et al., 2005; Santibañez et al., 2006; McGill et al., 2006); evaluamos además la expresión de GR.

Ninguna de las manipulaciones conductuales aumentó los niveles del RNAm de CRH, si bien en el EPM-luz se asociaron directamente con el tiempo que las ratas estuvieron en los brazos abiertos ($r=0.83$, $p=0.0003$) (Fig. 6B), indicando que las ratas más ansiosas tuvieron niveles menores de RNAm de CRH en la amígdala. Sin embargo, en estas condiciones experimentales los niveles relativos de RNAm de CRH-R1 ($F_{2,40}=7.3$, $p=0.002$) y de GR ($F_{1,16} = 8.75$, $p=0.009$) aumentaron (Fig. 6A).

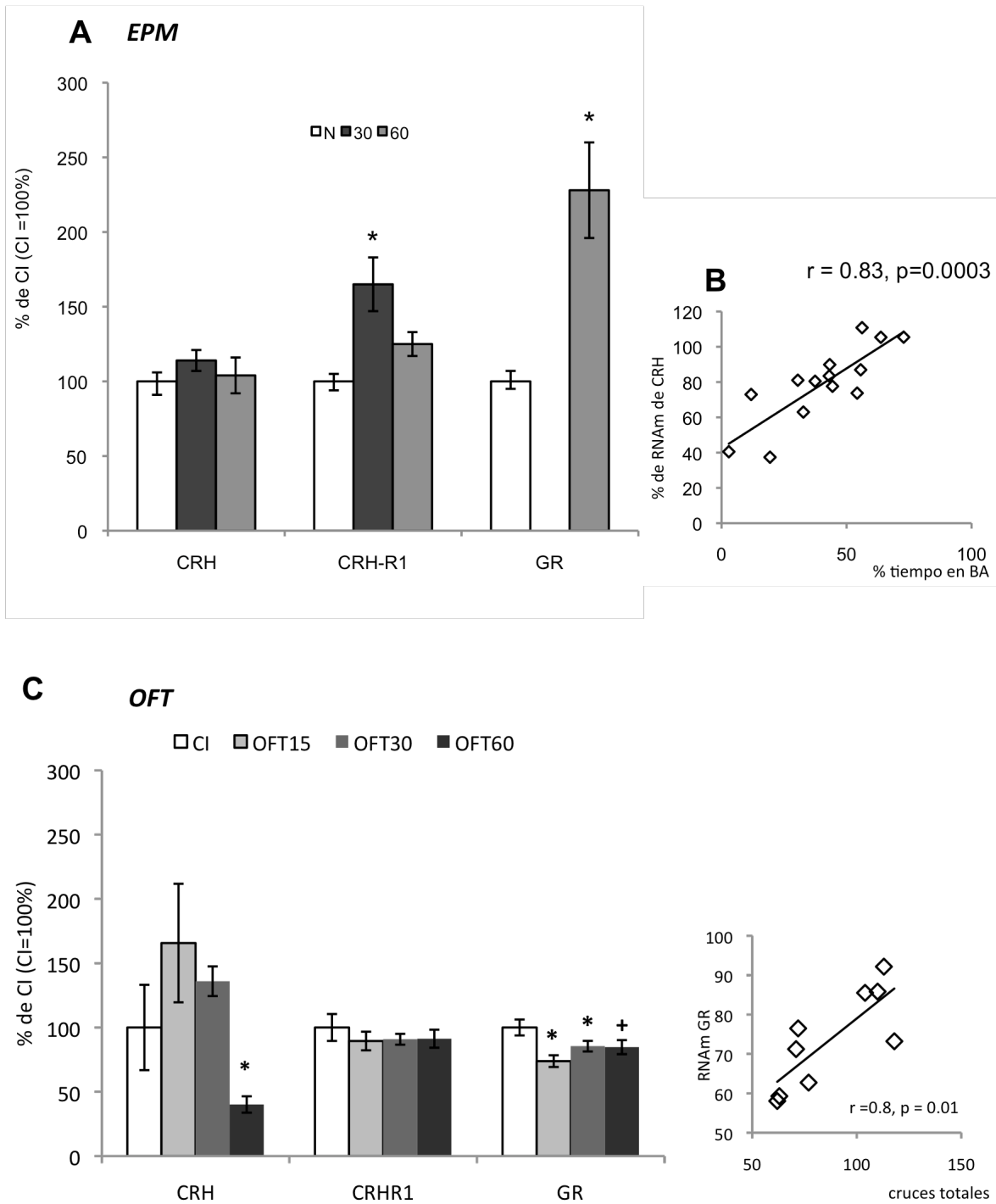


Figura 6. Cambios en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés en la amígdala. **A)** Ratas sometidas a *EPM* en la **etapa luminosa** del ciclo luz/oscuridad y sacrificados 15 (barras gris claro), 30 (barras gris oscuro) o 60 (barras negras) min después del protocolo conductual. **C)** Ratas sometidas a *OFT*. Los valores están expresados en % respecto a los grupos CI (barras blancas) cuyo promedio \pm esm = 100% (n=6-19/gpo).+ indican tendencias (diferencias significativas sólo por la prueba de t de student vs CI) y * cambios estadísticamente significativos (cuyas ANOVAS $F > 1.0$ y $p < 0.05$). **B** y **D** correlaciones significativas entre alguno de los genes analizados y conductas desplegadas en el *EPM* ú *OFT*.

En el *OFT* realizado durante el periodo luminoso disminuyeron los niveles de RNAm de CRH al igual que los de GR (Fig.6C) ($F_{5,30}=10.03$, $p<0.0001$ y $F_{5,41}=7.25$, $p<0.0001$.), estos últimos además, correlacionaron positivamente con locomoción ($r=0.8$, $p=0.01$, vs número de cruces totales) (Fig.6D).

Estos resultados sugieren que en condiciones de luz, el EPM activa vías características de ansiedad; el OFT las inhibe pero, en ninguno de los dos casos, los niveles de expresión de estos genes correlacionan con mayor ansiedad y en cambio, en el OFT los de GR se asociaron a mayor locomoción.

En los modelos explorados en la oscuridad, no observamos cambios significativos en los niveles relativos de CRH ni CRH-R1 aunque éste último en el *OFT*, tendió a disminuir (Fig. 7A, 7C y reportado en Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). Sí se encontró en cambio, una asociación inversa entre los niveles de RNAm del CRH-R1 de *EPM-osc* y el número de entradas totales (locomoción): las ratas con mayor motilidad tuvieron menores niveles de CRH-R1 en la amígdala (Fig. 7B). Además, los niveles de RNAm de CRH se asociaron a manera de U con la conducta de ansiedad (ver figura 6C del anexo).

En el *OFT* aumentaron los niveles de GR ($F_{5,43}=1.64$, $p=0.009$) (Fig. 7C), si bien dichos cambios no correlacionaron con variables conductuales ni con la secreción de CORT; en cambio, aunque los niveles de CRH-R1 tendieron a disminuir, se asociaron significativamente con la concentración de CORT (Fig.7D) indicando que las ratas con mayor secreción de CORT tuvieron mayores niveles de RNAm de CRH-R1 en la amígdala.

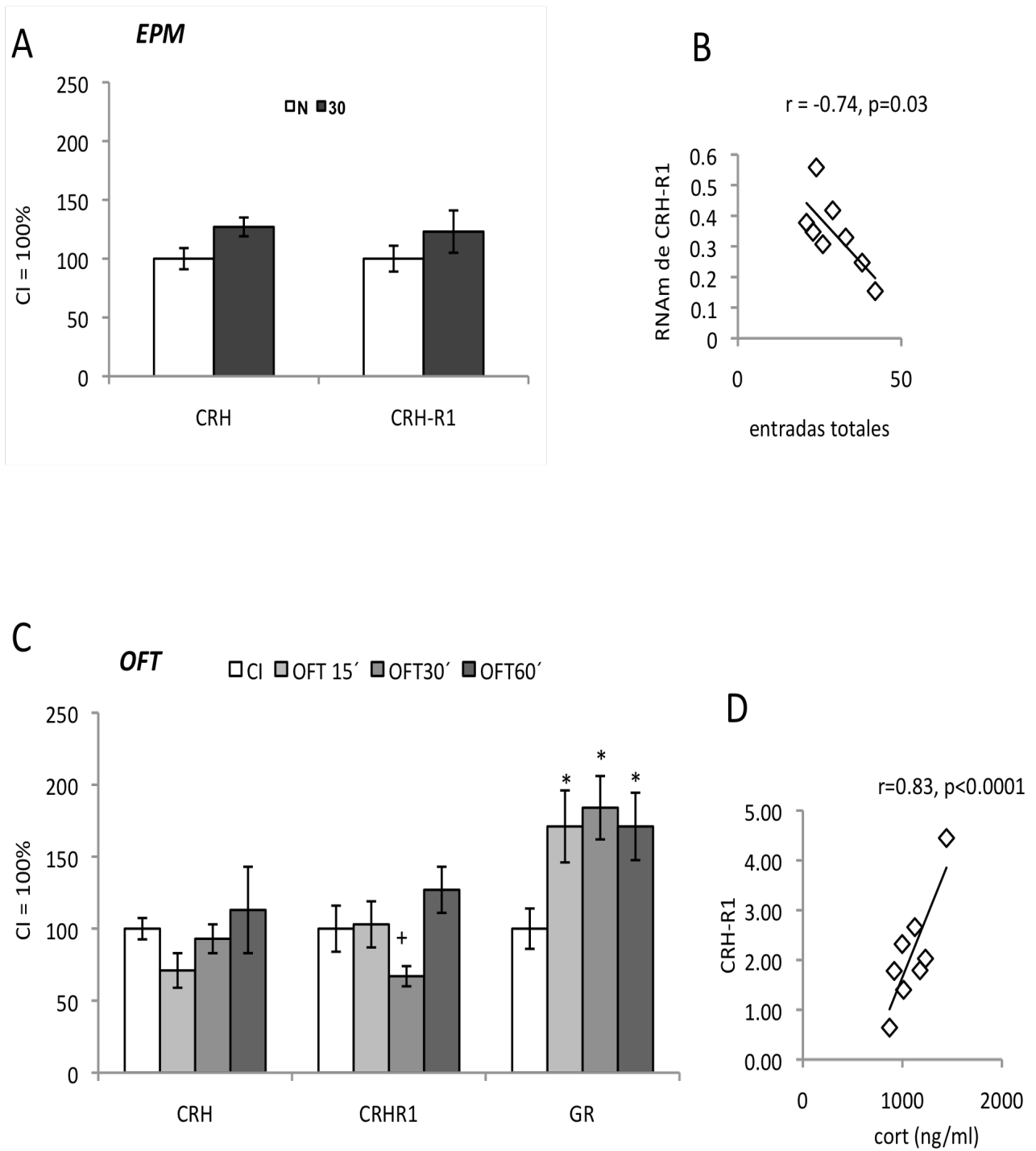


Figura 7. Cambios en los niveles de expresión de genes de respuesta a estrés en la amígdala. **A)** Ratas sometidas a *EPM* en la **etapa de oscuridad** del ciclo luz/oscuridad 30 min (barras gris oscuro) después del protocolo conductual. **C)** Ratas sometidas a *OFT* y sacrificadas 15 (barras gris claro), 30 (barras gris oscuro) ó 60 min (barras negras) después del protocolo conductual. Los valores están expresados en % respecto a los grupos CI (barras blancas) cuyo promedio \pm esm = 100% (n=6-19/gpo).+ indican tendencias (diferencias significativas sólo por la prueba de t de student vs CI) y * cambios estadísticamente significativos (cuyas ANOVAS $F > 1.0$ y $p < 0.05$). **B** y **D** correlaciones significativas entre los genes analizados ó conductas desplegadas en el *EPM* ú *OFT*.

Estos resultados indican que efectuar la prueba, tanto el EPM como el OFT, en la oscuridad evoca escasa activación de los genes de respuesta a estrés en la amígdala. En el caso del EPM, los niveles de CRH-R1 que se mantienen basales después de la prueba, están asociados a menor locomoción y no a la ansiedad, confirmando la naturaleza poco adversa de esta condición experimental. Los resultados apoyan la asociación de circuitos CRHérgicos con aumento en el estado de alerta, exploración y/o locomoción. En el OFT, si bien los niveles de GR aumentaron, no se relacionaron con conducta ni con otros marcadores de estrés. Como los niveles de CRH-R1 y CORT correlacionaron positivamente, se evidencia en estas condiciones la regulación positiva que ejercen los glucocorticoides sobre el sistema CRHérgico amigdalino.

3.2 Vía TRHérgica

En el *EPM*-luz, el contenido de TRH tendió a aumentar en el grupo sacrificado 60 min después de la prueba (significativo sólo por t-student, $p < 0.05$) al igual que los niveles de RNAm de TRH ($F_{2,42} = 5.3$, $p = 0.01$) mientras que los de TRH-R1 (t-student, $p < 0.05$) y PPII, disminuyeron ($F_{2,24} = 4.0$, $p = 0.03$) (Fig. 8A), los niveles de RNAm del TRH-R2 no cambiaron. Los análisis de correlación indicaron que la actividad del TRH amigdalino fue inversa a la conducta de ansiedad: los animales que mostraron menor ansiedad (mayor % de tiempo en los brazos abiertos) tuvieron mayores niveles de RNAm de TRH y menor contenido de TRH en la amígdala (Figs. 8B y 8C, respectivamente), asociaciones que apoyan lo publicado anteriormente para el modelo de *EPM* realizado en la oscuridad (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008).

Cuando se analizan los valores de la media \pm S.E.M. del contenido de TRH de las ratas sometidas al *EPM* y sacrificadas a los 60 min, éste es mayor que las del grupo control sugiriendo una inhibición de la liberación causada por el evento estresante. Sin embargo, el análisis puntual de cada individuo mostró que las ratas más ansiosas fueron las que presentaron menor síntesis y liberación de TRH en la amígdala corroborando lo expresado en el párrafo anterior. Ahora bien, el aumento en el contenido de TRH indicaría inhibición de la liberación pero el aumento en el RNAm sugiere aumento en la síntesis, indicativo de activación neuronal en este grupo; es posible considerar dos eventos concurrentes al evaluar la media de los grupos; de ahí la importancia de los análisis de correlación con los parámetros conductuales.

La exploración en el *OFT* en condiciones luminosas provocó cambios rápidos en el contenido de TRH que disminuyó a los 15 min y aumentó, respecto al grupo control intacto, a los 30 ($F_{3,46}= 8.4$, $p=0.0002$. Fig. 8D). Aunque el RNAm de proTRH no cambió significativamente, tendió a disminuir a los 15 min ($F_{5,40}=4.23$, $p=0.003$, prueba post hoc de Fisher entre CI y *OFT* 15: $p=0.08$) y los niveles de RNAm del TRH-R2 tendieron a aumentar a los 30 min ($F_{5,36}=2.2$, $p=0.07$). No hubo cambios en los niveles de RNAm del TRH-R1 ni de la PPII. (Fig. 8D).

En el *OFT* explorado en la etapa luminosa, los elementos que conforman la vía TRHérgica no correlacionaron con la conducta de ansiedad pero sí lo hicieron con conductas de locomoción: el número de cruces totales y en la periferia del *OFT* correlacionaron inversamente con el contenido de TRH (Figs. 8F y 9A) y con los niveles de RNAm de PPII (figuras 9B) mientras que con los de TRH la correlación fue directa (Fig. 8E). Es decir, las ratas que recorrieron más distancia en las zonas menos amenazantes del *OFT*, liberaron más TRH, sintetizaron más precursor de TRH y disminuyeron los niveles de la enzima PPII. Los niveles de RNAm del TRH-R2, correlacionaron positivamente con la concentración sérica de CORT (Fig. 9C). Estas evidencias sugieren que el *OFT* explorado durante la fase de reposo de los animales, propicia que la actividad de las neuronas TRHérgicas amigdalinas se asocie a conductas de locomoción y exploración y no con una menor ansiedad como ocurrió en el *EPM* (estos resultados y Gutiérrez-Mariscal et al., 2008).

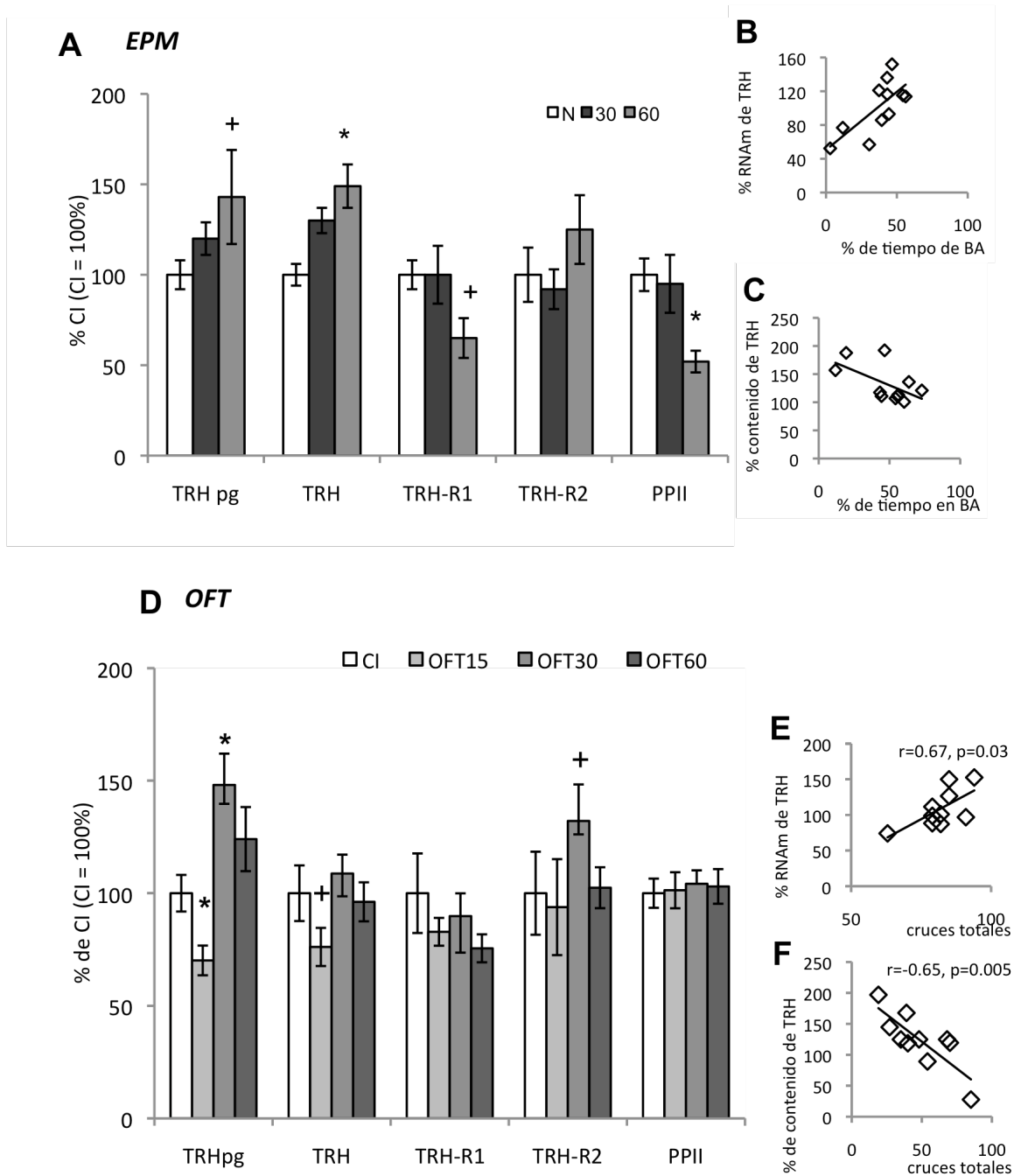


Figura 8. **A)** Cambios en el contenido de TRH (TRH pg) y en los niveles de RNAm de: precursor (TRH), de los dos receptores (TRH-R1 y TRH-R2) y de la enzima que degrada al TRH específicamente (PPII) en la amígdala de ratas sometidas a *EPM* en la **etapa luminosa** del ciclo luz/oscuridad y sacrificadas 30 (barras gris oscuro) ó 60 (barras gris claro) min después del protocolo conductual. **D)** Ratas sometidas a *OFT* y sacrificadas 15 (barras gris claro), 30 (barras gris oscuro) ó 60 min (barras negras) después del protocolo conductual. Los valores están expresados en % respecto a los grupos CI (barras blancas) cuyo promedio \pm esm = 100% (n=6-19/gpo).+ indican tendencias (diferencias significativas sólo por la prueba de t de student vs CI) y * cambios estadísticamente significativos (cuyas ANOVAS $F > 1.0$ y $p < 0.05$). Correlaciones significativas entre la conducta (de ansiedad en el *EPM* y de locomoción en *OFT*) y los niveles de RNAm de TRH (**B** y **E**) o contenido de TRH (**C** y **F**).

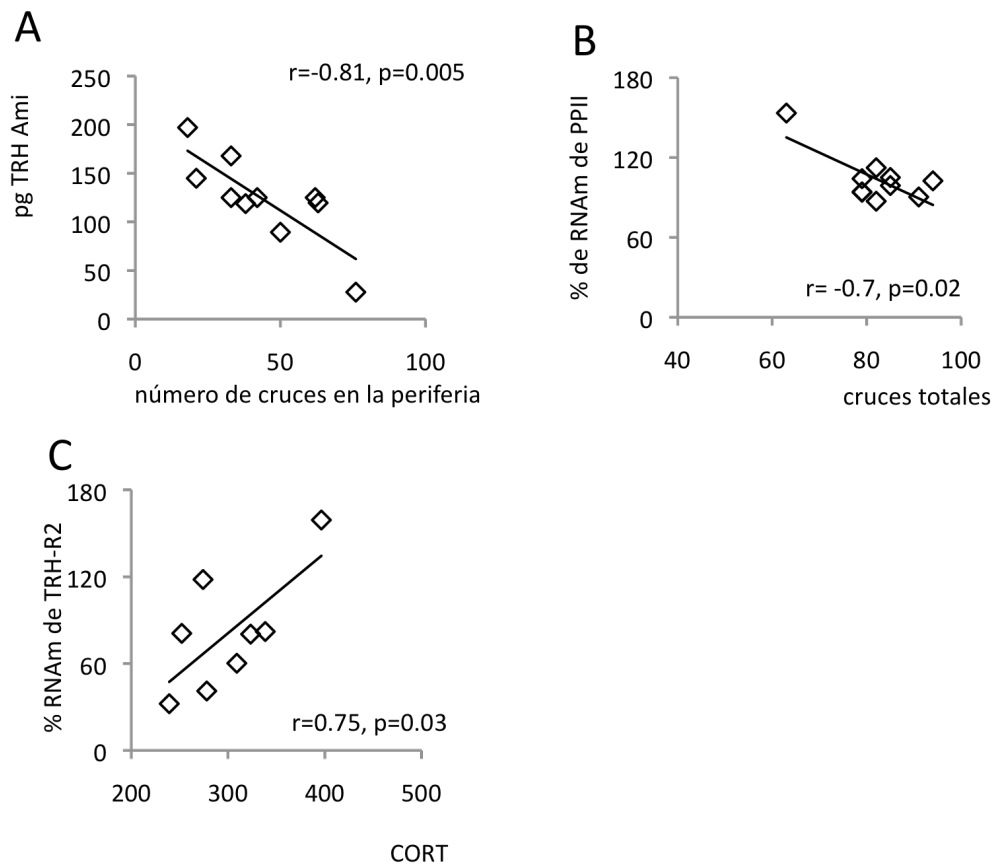


Figura 9. En el *OFT* realizado en la fase luminosa del ciclo luz/oscuridad, la actividad del circuito TRHérgico amigdalino se asocia con la locomoción. **A)** Las ratas más activas en la periferia del *OFT* liberaron más TRH en la amígdala. **B)** Las ratas que presentaron mayor locomoción en el *OFT* tuvieron los niveles más bajos del RNAm de la PPII. **C)** Correlación positiva entre secreción de CORT y niveles de RNAm de TRH-R2.

La exploración en el *EPM* durante la fase de actividad de los roedores produjo en los elementos que conforman la vía TRHérgica amigdalina, sólo una tendencia a disminuir los niveles relativos de RNAm del TRH-R1 (Fig. 10A) pero los niveles de RNAm de TRH correlacionaron positivamente con la conducta de ansiedad (Fig. 10B), indicando que aquellas ratas más ansiosas fueron las que sintetizaron menos TRH en la amígdala (estos resultados y Gutiérrez-Mariscal et al., 2008).

El *OFT* realizado en la oscuridad aumentó la expresión de todos los elementos que componen la vía TRHérgica excepto el contenido de TRH que no cambió. Como se ilustra en la figura 10C, los niveles relativos de RNAm de TRH aumentaron a los 3 tiempos medidos ($F_{3,37}=21.6, p<0.0001$) y los del TRH-R1, a los 15 min ($F_{3,40}=4.0, p=0.01$). Aunque los cambios en la expresión de TRH-R2 no fueron significativos, si mostraron una tendencia a aumentar a los 15 min

(t-student, $p < 0.05$). Los niveles de RNAm de PPII, al igual que los de TRH, aumentaron a los 3 tiempos medidos ($F_{3,39} = 31.1$, $p < 0.0001$).

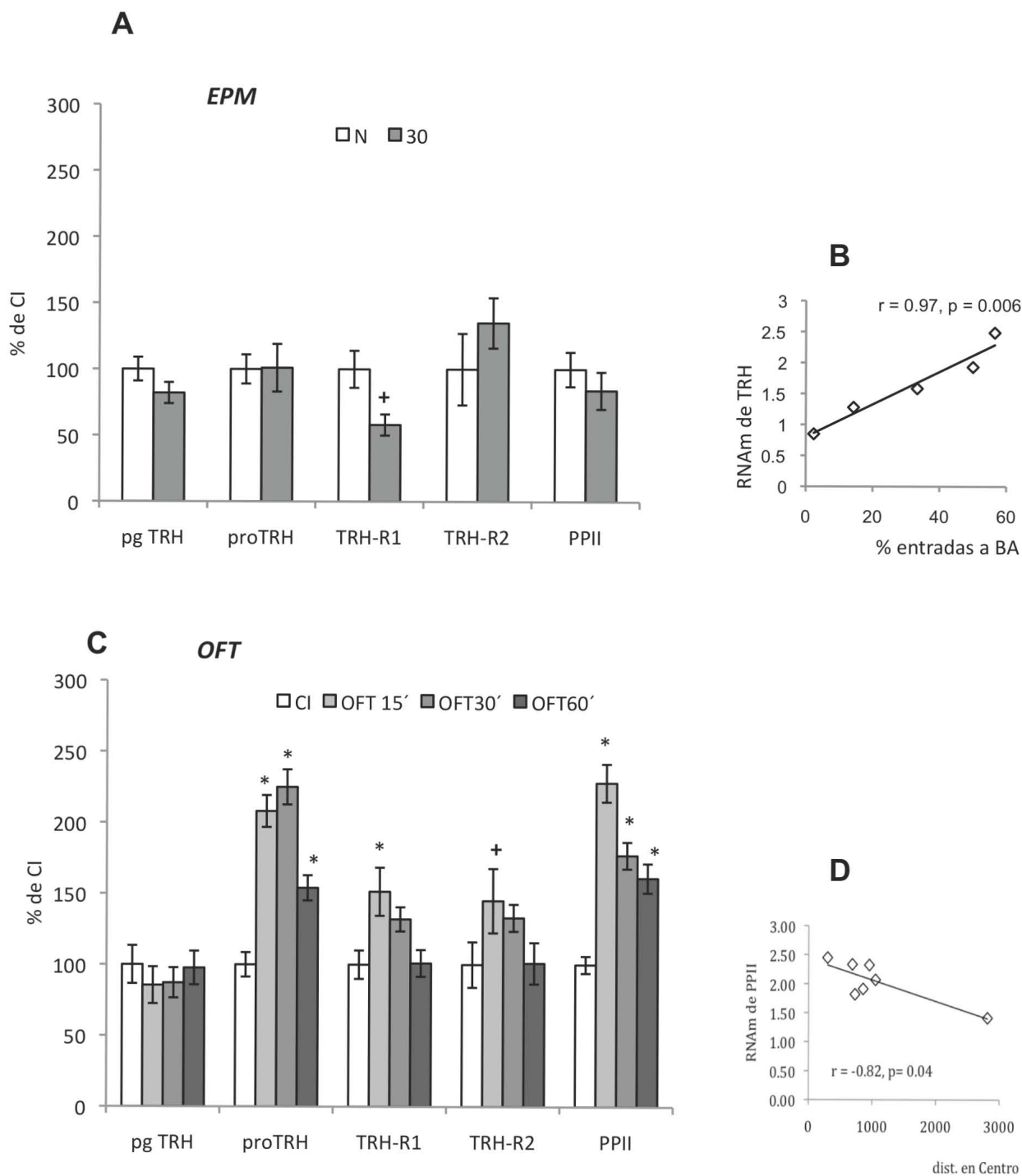


Figura 10. A) Cambios en el contenido de TRH (pg TRH) y en los niveles de RNAm de: precursor (TRH), de los dos receptores (TRH-R1 y TRH-R2) y de la enzima que degrada al TRH específicamente (PPII) en la amígdala de ratas sometidas a *EPM* en la **etapa oscura** del ciclo luz/oscuridad 30 min (barras gris) después del protocolo conductual. C) Ratas sometidas a *OFT* y sacrificadas 15 (barras gris claro), 30 (barras gris oscuro) ó 60 min (barras negras) después del protocolo conductual. Los valores están expresados

en % respecto a los grupos CI (barras blancas) cuyo promedio \pm esm = 100% (n=6-11/gpo).+ indican tendencias (diferencias significativas sólo por la prueba de t de student vs CI) y * cambios significativos (cuyas ANOVAS $F > 1.0$ y $p < 0.05$). **B)** En el *EPM*, las ratas menos ansiosas tuvieron mayores niveles de RNAm de TRH. **D)** En el *OFT*, las ratas que recorrieron más distancia en el centro de la arena, presentaron mayores niveles de RNAm de PPII.

De estos cambios en la vía TRHérgica como resultado de la exposición al *OFT* en condiciones de oscuridad, sólo los niveles de RNAm de la PPII se asociaron con alguna conducta: los animales que recorrieron menos distancia en el centro (los más ansiosos) tuvieron más RNAm de PPII (Fig. 10D).

En resumen, los cambios observados en los niveles de expresión de elementos que conforman la vía TRHérgica amigdalina mostraron una participación del TRH-R1 en EPM-luz como antes se observó en EPM-osc. En el EPM, ya sea en condiciones de luz o de oscuridad, la actividad de las neuronas TRHérgicas amigdalina se asoció inversamente a las conductas de ansiedad (estos resultados y Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). El OFT en condiciones de luz fue el modelo menos estresante y en estas condiciones, la actividad de las neuronas TRHérgicas de la amígdala no estuvo asociada a la conducta de ansiedad sino que fué proporcional a la locomoción y exploración. Explorar el OFT en condiciones de oscuridad estimuló la vía TRHérgica amigdalina pero esa activación correlacionó sólo sutilmente con ansiedad.

4. Efectos de la exploración de los modelos conductuales sobre Eje Hipotálamo Hipófisis Tiroideo

La exploración del *EPM* ó del *OFT* exigen un incremento en la motilidad de los animales en comparación con las condiciones habituales de éstos en el bioterio: el aumento en la locomoción podría constituir un reto metabólico causando cambios en la actividad del eje tiroideo (HHT) que es el circuito responsable de regular el metabolismo (Flier et al., 2000 y Joseph-Bravo, 2004). Por lo tanto, cuantificamos por RIA la concentración sérica de tirotropina (TSH) y de TRH en la eminencia media (EM), así como los niveles relativos de RNAm de proTRH y TRH-R1 en el NPV, por RT-PCR.

Ninguna de las manipulacions experimentales produjo cambios en la concentración de TSH en suero (Fig.11) como tampoco lo habíamos encontrado en otros paradigmas de ansiedad (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008); de hecho, sólo en el *MWM* se habían reportado incrementos en los niveles de TSH sugiriendo activación del eje tiroideo probablemente debido al aumento en la

demanda energética por el ejercicio del nado (Aguilar-Valles et al., 2007), mientras que en animales sometidos a restricción de movimiento (RES), o de inmovilización, el eje HPT se encuentra inhibido (García-Vázquez 2006, Cizza et al., 1996). Considerando que el estrés tiene un efecto inhibitorio sobre el HPT, los paradigmas de *EPM* y *OFT* quizá aumenten la demanda energética en los animales lo suficiente como para evitar una efecto inhibitorio al eje pero no como para causar una estimulación medible; esto lo apoya la falta de correlación negativa entre TSH y CORT observada.

Las neuronas hipotálamicas TRHérgicas sí mostraron cambios en alguno de los paradigmas. En condiciones de luz, el *EPM* aumentó los niveles de RNAm de TRH en el grupo sacrificado 15 min después de terminada la prueba ($F_{3,40}=6.1$, $p=0.002$) (Fig. 11A). Aunque el contenido de TRH no cambió, correlacionó directamente con el tiempo que las ratas pasaron en los brazos abiertos ($r = 0.758$, $p = 0.0003$) (las gráficas de correlaciones de esta sección se muestran en la sección XI, apéndice 2) implicando que a menor liberación, menor ansiedad. En el *OFT* en condiciones de luz sí aumentó el contenido de TRH en la EM (a los 30 y 60 min, $F_{5,44}=7.6$, $p<0.0001$; Fig. 11B), no correlacionó con ansiedad pero sí lo hizo con locomoción ($r = 0.650$, $p = 0.04$): las ratas que tuvieron mayor locomoción en la periferia, liberaron menos TRH en estas condiciones, también aumentaron los niveles relativos de RNAm de TRH-R1 a los 15 y 30 min ($F_{5,30}=3.0$, $p=0.02$, Fig. 11B) que no correlacionaron con conducta.

En condiciones de oscuridad, los cambios en el HHT también fueron diferentes en cada modelo: el *EPM* causó una disminución en el contenido de TRH (Fig. 11C); este aumento en la liberación correlacionó negativamente con locomoción (vs entradas totales BA+ BC, $r = -0.82$, $p = 0.01$), i.e. las ratas más activas liberaron más TRH (Gutiérrez-Mariscal et al. 2008 y ver sección XI) que no se tradujo en aumento de tirotrópina. En el *OFT* en cambio, aumentó el contenido de TRH a los 30 min ($F_{4,36}=4.3$, $p=0.006$), los niveles de RNAm de TRH-R1 a los 15 y 60 min ($F_{5, 35}=4.0$, $p=0.01$), y los de TRH-R2 a los 30 min ($F_{5, 38}=7.2$, $p<0.0001$) (Fig. 11D). En este modelo, el contenido de TRH en la EM no correlacionó con ansiedad pero sí lo hizo la concentración de TSH de manera directa con locomoción ($r=0.79$, $p=0.01$, ver Sección XI).

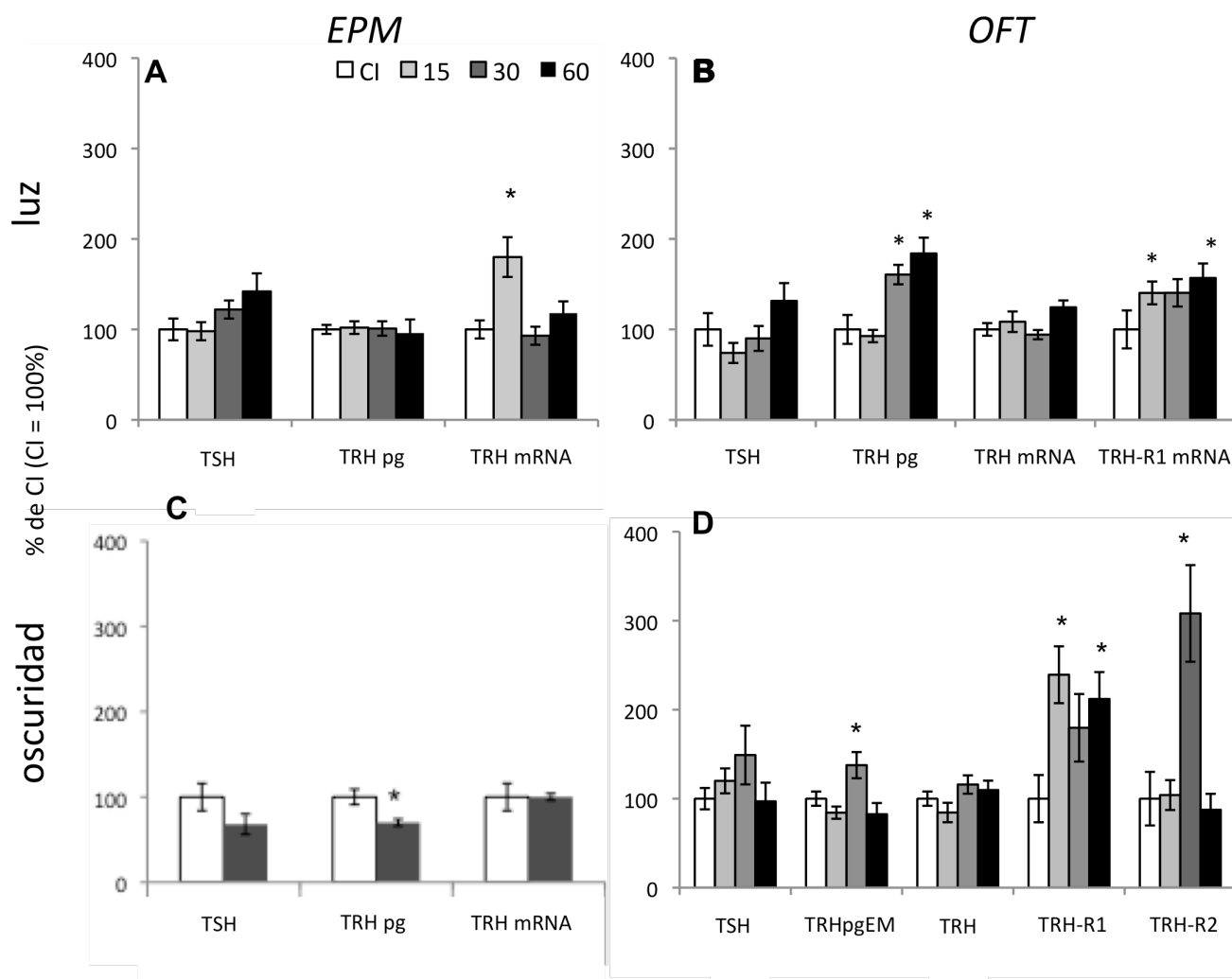


Figura 11. Parámetros bioquímicos indicativos de la actividad del eje hipotálamo hipófisis tiroideo (HHT) de ratas sometidas a *EPM* u *OFT* en la etapa luminosa del ciclo (**A** y **B**) ó en la de oscuridad (**C** y **D**) y sacrificados 15 (barras gris claro), 30 (barras gris oscuro) o 60 (barras negras) min después del protocolo conductual. Los valores están expresados en % respecto a los grupos CI (barras blancas) cuyo promedio \pm esm = 100% (n=6-19/gpo). *diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto a CI.

La exploración de los modelos no causó cambios en la concentración de tirotrina en suero pudiendo indicar ausencia de efectos generales a nivel de suero pero hubo cambios en los niveles de expresión de TRH o sus receptores y de contenido de TRH en la EM. Los cambios además, correlacionaron con conductas de ansiedad y locomoción y fueron dependientes del modelo y del momento de la exploración.

El modelo de EPM parece estimular las neuronas TRHérgicas del NPV al aumentar el RNAm en condiciones de luz y producir liberación de TRH en la oscuridad, similar a lo encontrado previamente en ratas sometidas a ED (Gutiérrez Mariscal et al., 2008) ó a MWM (Aguilar-Valles et al., 2007) que aumentaron la expresión de TRH en el NPV, en todos los casos, pese al fuerte incremento de glucocorticoides. Es posible que el incremento en los niveles de TRH del NPV en el EPM luz ó el aumento en la liberación de TRH a la EM en el EPM osc, sin la activación del eje tiroideo pudiera deberse a una estimulación de las neuronas no hipofisiotrópicas que modulan al sistema autónomo (Sánchez et al., 2001; Sawchenko et al., 1996) lo cual debe aún ser demostrado. La activación de las neuronas TRHérgicas hipotalámicas se relaciona con la conducta en el EPM dependiendo del estado de alerta del animal: en la luz, a mayor liberación de TRH, mayor ansiedad y en la oscuridad, mayor locomoción.

Los animales que exploraron el OFT presentaron inhibición de la liberación de TRH y aumento en los niveles de RNAm de los receptores a TRH en el NPV. Los elementos del eje tiroideo no correlacionaron con ansiedad sino con locomoción. Los cambios fueron independientes del momento de la exploración pero no así su asociación con locomoción siendo poporcional en el periodo de actividad de los animales e inversa durante la fase de reposo.

Los resultados del EPM realizado en la luz apoyan evidencias previas del TRH hipotalámico como parte de los circuitos involucrados en las conductas de ansiedad (Gutiérrez Mariscal et al., 2008) mientras que los del OFT y aportan nueva evidencia de su relación con conductas de locomoción previamente reportado para el EPM en condiciones de oscuridad (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). En la tabla 5 se presenta un esquema con el resumen de los resultados obtenidos en la sección del eje Tiroideo.

EJE TIROIDEO (HHT)				
	[TRH]	proTRH	TRH-R1	[TSH]
<i>EPM</i> <i>LUZ</i>	= α	↑	=	=
<i>EPM</i> <i>OSC</i>	↓ α	=	n.a.	=
<i>OFT</i> <i>LUZ</i>	↑↑ $1/\alpha$	=	↑↑	=
<i>OFT</i> <i>OSC</i>	↑	=	↑↑	= α

Tabla 5. Esquema de los cambios en el eje tiroideo y su correlación con las conductas desplegadas en el *EPM* y *OFT* en condiciones de luz y oscuridad. Las condiciones experimentales se indican en la columna extremo-izquierda. [TRH]: contenido de TRH en la EM; proTRH y TRH-R1: niveles de RNAm en el NPV; [TSH]: concentración en suero de tirotropina. ↑ indica aumento, ↓ disminución, = sin cambios y n.a., no analizado. Las correlaciones con ansiedad se indican en los recuadros de fondo gris y con locomoción, en fondo negro. Correlación proporcional: α e inversamente proporcional: $1/\alpha$. Los recuadros blancos indican que no hubo correlación con ninguna conducta ni con [CORT].

IX. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis fue profundizar en el estudio del papel del TRH amigdalino en las conductas de ansiedad. En la tesis de maestría demostramos que el TRH exógeno disminuye la ansiedad en la prueba de enterramiento defensivo (*ED*) y la activación de las neuronas TRHérgicas de la amígdala es inversamente proporcional al estado de ansiedad provocado por el modelo de *ED* (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008). Ahora utilizamos los modelos del laberinto en cruz elevado (*EPM*) y la prueba de campo abierto (*OFT*) que son paradigmas en los que no se administran estímulos físicos adversos, como fue el caso del *ED*, que es un paradigma con un fuerte componente adverso en el cual el animal recibe un choque eléctrico cada vez que toca el electrodo situado en la caja. Para averiguar si el papel del TRH en las conductas de ansiedad se veía modulado por el estado de alerta de los animales previo a las pruebas, en este trabajo comparamos ambos modelos en condiciones de luz y de oscuridad, cuantificamos las conductas de ansiedad y las de locomoción y exploración; además monitoreamos la respuesta del eje adrenal a las pruebas y la actividad de circuitos amigdalinos de respuesta a estrés. Por último, debido al papel neuroendócrino del TRH y al aumento en actividad provocado por la exploración de los modelos, investigamos si el eje tiroideo era activado por la experiencia en el *EPM* o en el *OFT*. En todas las condiciones

buscamos asociaciones entre los parámetros bioquímicos y los conductuales. En las tablas 6 y 7 se esquematizan los resultados obtenidos en este trabajo, esperando facilitar la lectura de esta discusión.

	EJE ADRENAL (HHA)			
	CRH	CRH-R1	GR	[CORT]
<i>EPM</i> <i>LUZ</i>	↑ <u>tend</u> $1/\alpha$	=	= U	↑↑↑ α
<i>EPM</i> <i>OSC</i>	=	=	=	↑↑
<i>OFT</i> <i>LUZ</i>	= *	↑ *	↓	↑↑ $1/\alpha$
<i>OFT</i> <i>OSC</i>	↑ $1/\alpha$ **	↑ **	=	↑↑↑ α

Tabla 6. Esquema de los cambios en el eje adrenal y su correlación con las conductas desplegadas en el *EPM* y *OFT* en condiciones de luz y oscuridad. Las condiciones experimentales se indican en la columna extremo-izquierda. CRH, CRH-R1 y GR: niveles de RNAm en el NPV; [CORT]: concentración en suero de corticosterona. ↑ indica aumento, ↓disminución, = sin cambios y tend cambios no significativos. Las correlaciones con ansiedad se indican en los recuadros de fondo gris y con locomoción, en fondo negro. Correlación proporcional: α e inversamente proporcional: $1/\alpha$. * indica correlación proporcional con [CORT], ** correlación inversamente proporcional con [CORT]. Los recuadros blancos indican que no hubo correlación con ninguna conducta ni con [CORT].

El *OFT* fue el modelo que tuvo la respuesta del eje HHA más robusta al estrés: independientemente si la prueba se realizó en la luz ó en la oscuridad, la concentración sérica de CORT aumentó pero en condiciones de luz, los valores regresaron a basales a los 60 min mientras que en la oscuridad, se matuvieron altos hasta 60 min después de la prueba. En el NPV, los niveles del RNAm del receptor a CRH (CRH-R1) aumentaron, mientras que los de CRH tendieron a aumentar pero sólo en condiciones de oscuridad. Incrementos en la expresión de CRH-R1 del NPV se han detectado en múltiples situaciones estresantes y se ha propuesto como un mejor marcador que los cambios en el RNAm de CRH debido a los altos niveles basales de este último (Turnbull y Rivier, 1997). Sin embargo, la correlación positiva entre los niveles de RNAm de CRH y CRH-R1 en condiciones de luz sugiere una respuesta conjunta asociada a la experiencia del OFT. Los efectos de retroalimentación negativa en el eje HHA por el aumento de glucocorticoides (Warne, 2009; Watts, 2005; Di et al., 2003 y 2005) explican la disminución en los niveles del RNAm del receptor de GR en condiciones de luz, así como las correlaciones negativas entre CORT y CRH/CRH-R1 en

la oscuridad. En la amígdala sólo aumentaron los niveles de RNAm de GR en condiciones de oscuridad mientras que en la condición de luz, disminuyeron. La expresión de CRH (en la luz) y de CRH-R1 (en la oscuridad) disminuyó a los 60 y 30 min, respectivamente.

AMÍGDALA								
GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS				VÍA TRHÉRGICA				
	CRH	CRH-R1	GR	[TRH]	proTRH	TRH-R1	TRH-R2	PPII
<i>EPM</i> <i>LUZ</i>	= 1/α	↑	↑	↑ 1/α	↑ 1/α	↓	=	↓
<i>EPM</i> <i>OSC</i>	= U	=	n.a.	=	= 1/α	↓ <u>tend</u>	=	=
<i>OFT</i> <i>LUZ</i>	↓	=	↓↓ α	↓↑ α	↓ <u>tend</u> α	=	↑ <u>tend</u> *	= 1/α
<i>OFT</i> <i>OSC</i>	=	↓ <u>tend</u> *	↑↑↑	=	↑↑↑	↑	↑ <u>tend</u>	↑↑↑ α

Tabla 7. Esquema de los cambios en los niveles de expresión de los genes de respuesta a estrés y en la vía TRHérgica amigdalina y su correlación con las conductas desplegadas en el *EPM* y *OFT* en condiciones de luz y oscuridad. Las condiciones experimentales se indican en la columna extremo-izquierda. CRH, CRH-R1 y GR: niveles de RNAm en amígdala; [TRH]: contenido de TRH en amígdala y proTRH, TRH-R1, TRH-R2 y PPII: niveles de RNAm en amígdala. ↑ indica aumento, ↓disminución, = sin cambios, tend cambios no significativos y n.a. no analizado. Las correlaciones con ansiedad se indican en los recuadros de fondo gris y con locomoción, en fondo negro. Correlación proporcional: α e inversamente proporcional: 1/α. * indica correlación proporcional con [CORT], ** correlación inversamente proporcional con [CORT]. Los recuadros blancos indican que no hubo correlación con ninguna conducta ni con [CORT].

A pesar de la respuesta integral del eje HHA a la exploración del *OFT*, ésta no se relaciona con mayor ansiedad como tampoco lo hacen los marcadores de estrés en la amígdala. Las asociaciones ocurren preferentemente con las conductas de exploración y locomoción. Los niveles circulantes de CORT se asociaron con la conducta de locomoción dependiendo del estado previo del animal: en reposo, inhibiéndola y en alerta, promoviéndola. Además los cambios en la expresión de GR amigdalino en condiciones de luz se asociaron a mayor locomoción. Sólo, los niveles de RNAm de CRH en el NPV correlacionaron con menor ansiedad en la oscuridad.

El conjunto de los resultados sugieren que el *OFT* produce respuesta robusta del eje del estrés que es sobre todo debida a la locomoción; la prueba no es detectada como una experiencia ansiosa.

Qué efectos se producen en la transmisión TRHérgica amigdalina? Cuando los animales exploran el *OFT* en su periodo de actividad, la respuesta de los elementos de la post-sinapsis TRHérgica amigdalina es muy rápida (15 min) normalizándose, en el caso de los receptores

TRH-R1 y TRH-R2, a los 60 min. Estos cambios ocurren sin variaciones en la liberación del péptido. Dados los resultados en otros paradigmas como la estimulación subumbral amigdalina en donde, a etapas tempranas del establecimiento del *kindling* amigdalino cambian los niveles de RNAm de TRH y alguno de los receptores en otras regiones incluyendo el lado contralateral a la estimulación, los resultados aquí presentados apoyan efectos transinápticos (de Gortari et al 2006). Ni el mensajero de TRH ni el contenido de péptido se asociaron con ninguna conducta (ansiedad o locomoción), la única correlación significativa fue entre el RNAm de la PPII con ansiedad. Concluimos que en la exploración del *OFT* en condiciones de oscuridad, existe una fuerte activación de los circuitos TRHérgicos amigdalinos que se asocian sutilmente con menor ansiedad; esto pudiera sugerir que el modelo activa circuitos ansiolíticos (i.e. TRHérgicos) que impiden se perciba como un fuerte estrés psicológico.

En condiciones de luz, los cambios en las variables TRHérgicas son ligeros: disminución del RNAm de TRH y aumento del TRH-R2 (tendencias); pero sí involucran variaciones en el contenido de TRH que disminuye transitoriamente (a los 15 min) y aumenta a los 30 min. Las variaciones indican una inhibición transitoria que no está asociada a conductas de ansiedad sino de locomoción: posteriormente, se evidenció una estimulación que apoya a que las ratas liberaron más TRH y que sintetizaron más RNAm de TRH-R2, y fueron las que realizaron mayor número de cruces totales o en la periferia del *OFT*. Llama la atención el aumento en los niveles de RNAm de TRH-R2 y su asociación positiva con la concentración de CORT pues en otros paradigmas de ansiedad, sólo el TRH-R1 había sido regulado y se desconoce si puede ser regulado por glucocorticoides; sin embargo, en experimentos de restricción de movimiento, donde la liberación de TRH está inhibida en amígdala, la expresión del TRH-R2 está incrementada mientras que la de PPII inhibida (García-Vázquez, 2006). Estos datos apoyan una posible función diferenciada de las neuronas TRHérgicas que estimularían vías ansiolíticas mediadas por el TRH-R1 (Zeng et al., 2007) y otras, posiblemente de otros tipos de estrés, por el TRH-R2. En conjunto los cambios observados en la vía TRHérgica amigdalina después de explorar el *OFT* en condiciones de luz sugieren su participación en conductas de locomoción y exploración.

En el caso del paradigma del *EPM* se encontró, aunque menos fuerte, una respuesta del eje HHA reflejada en un aumento en la secreción de CORT en condiciones de luz y oscuridad. La respuesta fue mayor en la luz donde aumentan los niveles de RNAm de CRH del NPV (tendencia). En esta condición, las ratas más ansiosas, presentan mayor secreción de CORT y menores niveles de CRH mientras que en la oscuridad, la conducta de ansiedad mostró una asociación a manera de U con los niveles del RNAm de GR. Corroborando el componente ansioso del *EPM*, los circuitos

amigdalinos se encontraron activados en condiciones de luz (los niveles de CRH-R1 y de GR aumentan). Explorar el *EPM* en estado de alerta no produce cambios en las variables de respuesta a estrés emocional y asocia a manera de U la conducta de ansiedad con los niveles de CRH: las ratas con conductas extremas tienen niveles altos de CRH. Los efectos inhibitorios de altos niveles de CRH-R1 sobre locomoción, que se evidencian en la correlación negativa entre estas dos variables en la condición de oscuridad, apoyan el valor adaptativo de cierto nivel de actividad CRHérgica amigdalina. Estos resultados pudieran indicar que existe un nivel de activación óptimo en el despliegue de conductas apropiadas, y que exceso o falta de activación de transmisión CRHérgica amigdalina puede ser maladaptativa. Por último, en condiciones luminosas, los niveles del RNAm de CRH son bajos (Chang y Opp., 2001; Yokoe et al., 1988) y es cuando correlacionan con mayor ansiedad, corroborando que la falta de transmisión CRHérgica propicia conductas extremas (Croiset et al., 2000) lo que ha sido demostrado en situaciones de arousal/hiperactividad y aprendizaje (Gallagher 2009, Jöels 2006, Sandi et al., 2004; Conrad 1999). Resultados anteriores apoyan la propuesta de que el CRH tiene funciones ansiogénicas sólo en ciertos contextos y que su activación tiene funciones adaptativas en otros (Aguilar-Valles et al., 2006; Gutiérrez-Mariscal et al., 2008), estos resultados indican que sólo el *EPM* en condiciones de luz estimuló vías características de ansiedad (CRH-R1 en amígdala, Muller et al. 2003).

Los cambios en las variables TRHérgicas no permiten inferir activación ni inhibición ya que en la luz la liberación parece inhibirse pero la síntesis aumenta; paralelamente se inhibe la expresión de PPII y de R1; en la oscuridad, el único cambio que se observó fue un aumento (tendencia) en los niveles de TRH-R1. El aumento en los niveles de RNAm de TRH sugiere activación de estas neuronas pero esto no puede afirmarse pues los niveles de péptido aumentan, sugiriendo inhibición de la liberación (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008; Aguilar-Valles et al., 2007; de Gortari et al., 2006). La disminución de los niveles de RNAm de PPII y de TRH-R1 pudieran deberse a una regulación heteróloga ya que no se observó un aumento de la liberación de TRH como se observó en otros paradigmas (Aguilar-Valles et al., 2007). Sin embargo, los niveles de TRH y su RNAm sí se asociaron con conductas de ansiedad: en ambas condiciones, los animales menos ansiosos tuvieron mayor síntesis de RNAm de TRH y en condiciones de luz, además liberaron más TRH en la amígdala.

En conjunto, los resultados obtenidos en el *EPM* apoyan la función ansiolítica de las neuronas TRHérgicas amigdalinas al asociar la expresión de TRH con menores niveles de ansiedad, independientemente del estado de actividad de los animales previo a la prueba. El *OFT* no desencadena cambios en la expresión del CRH amigdalino, sugiriendo que no logra alcanzar los

niveles de ansiedad detectables en esta estructura, los cambios en las variables TRHérgicas durante *OFT-osc* apoyan al TRH en su participación de alerta y la asociación sutil con menor ansiedad.

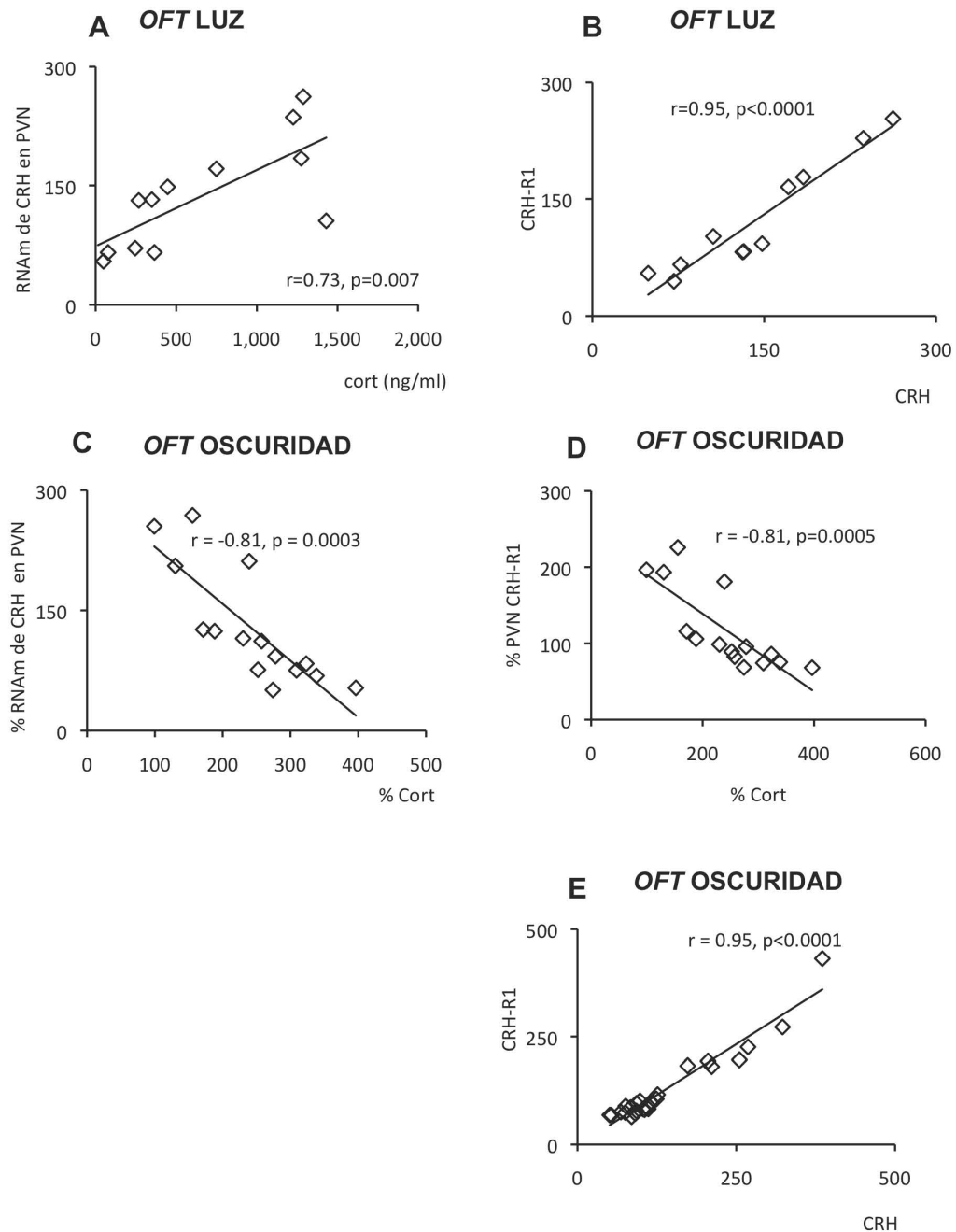
En resumen, la evidencia obtenida apoya el papel ansiolítico del TRH liberado en las neuronas amigdalinas (Gutiérrez-Mariscal et al., 2008) en condiciones que aumentan el tono CRHérgico en esa estructura como ocurre en el *EPM* realizado en la luz. Complementariamente, en condiciones en donde los sistemas CRHérgicos amigdalinos no son estimulados, como en los experimentos de *OFT*, ocurre activación de los sistemas TRHérgicos locales y su actividad se asocia a conductas de locomoción. Si bien la investigación sobre la función del TRH en el sistema límbico ha tenido un fuerte componente descriptivo en el cual se intentó “mapear” la respuesta neuronal en distintos paradigmas, los resultados obtenidos hasta el momento sugieren que la interacción de las señales neuronales activadas por cada prueba interfieren en forma diferencial con el efecto de glucocorticoides sobre la síntesis de CRH y de TRH, de una manera región-específica. Es necesario aún caracterizar otras regiones pero los resultados en amígdala e hipotálamo nos permiten ahora abordar un nuevo enfoque mas integrado en el cual intentemos caracterizar las vías TRHérgicas y su interacción con otros neurotransmisores. Además, incidir sobre su transmisión de manera región específica con el paradigma conductual adecuado.

X. CONCLUSIONES

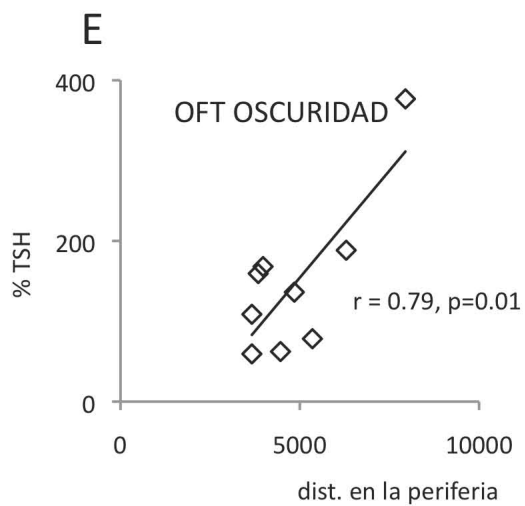
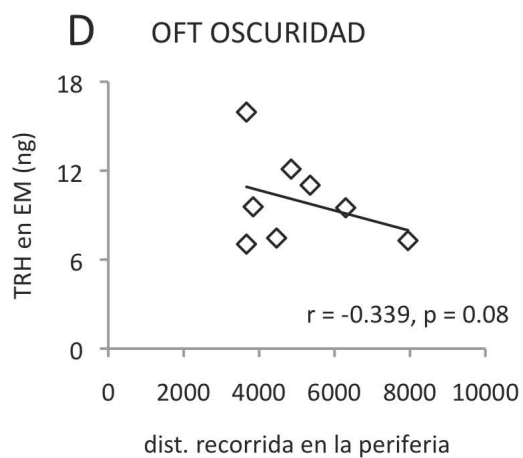
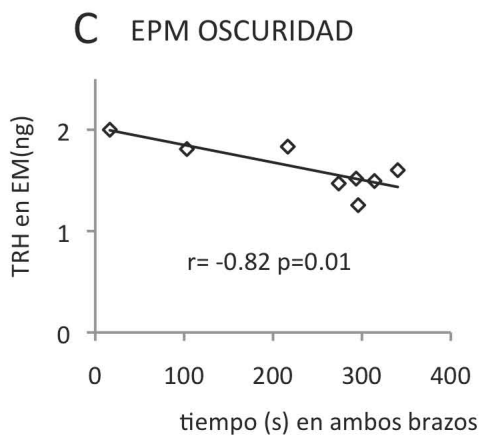
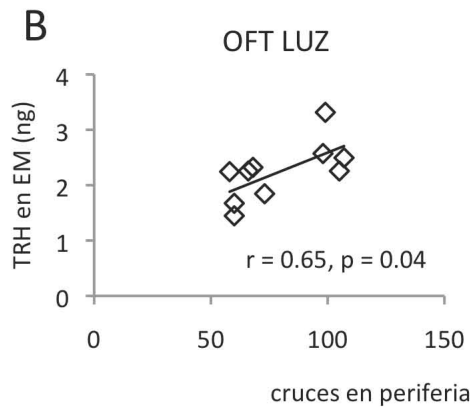
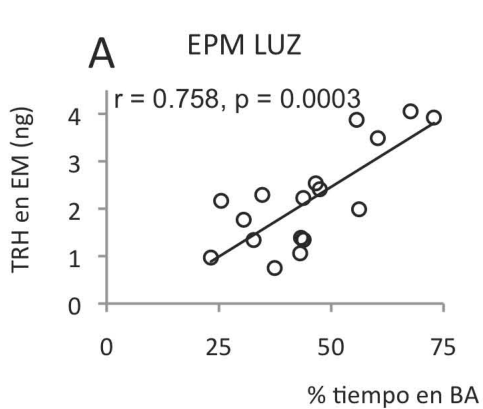
- Las conductas de ansiedad y locomoción en el *EPM* y en el *OFT* son independientes del estado de alerta de los animales previo a la prueba.
- Todas las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo causan aumento en la liberación de corticosterona que es mayor a tiempos cortos en el modelo *EPM* realizado en la etapa luminosa del ciclo y puede durar hasta 60 min en ambos modelos.
- El *OFT* produce una activación integral del eje HHA que se relaciona con mayor locomoción y menor ansiedad. No activa circuitos de ansiedad en la amígdala.
- El modelo *EPM* realizado en la luz es la condición más ansiogénica, evidenciado por niveles aumentados de CRH-R1 en amígdala.
- El modelo *OFT* realizado en la luz es la condición menos adversa pues en la amígdala causa disminución de CRH y GR.
- En ambos modelos existe asociación inversa entre la vía TRHérgica amigdalina y la ansiedad pero más robustamente, en el *EPM*.
- En el *OFT*-luz además, la actividad de las neuronas TRHérgicas amigdalinas se asocia a mayor locomoción.

XI. APÉNDICES

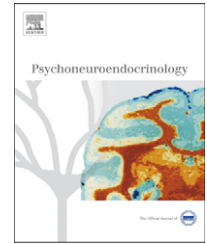
Apéndice 1. Correlaciones entre elementos que componen el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal en respuesta a la exploración del OFT. Se indica en cada gráfica el coeficiente de correlación “r” que es significativo cuando > 0.6 y $p < 0.05$.



Apéndice 2. Correlaciones entre el contenido de TRH en la EM ó TSH y conducta. Se indica en cada gráfica el coeficiente de correlación “r” que es significativo cuando > 0.6 y $p < 0.05$



XII. ANEXO

Available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/psyneuen

Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety

Mariana Gutiérrez-Mariscal^a, Patricia de Gortari^b, Carolina López-Rubalcava^c, Adrián Martínez^b, Patricia Joseph-Bravo^{a,*}

^aInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), A.P. 510-3, Cuernavaca, MOR 62210, México

^bDepartamento de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría, Ramón de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370 México D.F., México

^cDepartamento de Farmacobiología, CINVESTAV, Sede Sur. Calz. de los Tenorios No. 235, Col. Granjas Coapa, 14330 México D.F., México

Received 13 June 2007; received in revised form 1 November 2007; accepted 5 November 2007

KEYWORDS

TRH;
CRH;
Amygdala;
Septum;
Hypothalamus;
Anxiety;
Elevated plus maze;
Defensive burying;
Wistar kyoto

Summary

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) was first described for its neuroendocrine role in controlling the hypothalamus–pituitary–thyroid axis (HPT). Anatomical and pharmacological data evidence its participation as a neuromodulator in the central nervous system. Administration of TRH induces various behavioural effects including arousal, locomotion, analepsy, and in certain paradigms, it reduces fear behaviours. In this work we studied the possible involvement of TRHergic neurons in anxiety tests. We first tested whether an ICV injection of TRH had behavioural effects on anxiety in the defensive burying test (DBT). Corticosterone serum levels were quantified to evaluate the stress response and, the activity of the HPT axis to distinguish the endocrine response of TRH injection. Compared to a saline injection, TRH reduced cumulative burying, and decreased serum corticosterone levels, supporting anxiolytic-like effects of TRH administration. The response of TRH neurons was evaluated in brain regions involved in the stress circuitry of animals submitted to the DBT and to the elevated plus maze (EPM), tests that allow to correlate biochemical parameters with anxiety-like behaviour. In the DBT, the response of Wistar rats was compared with that of the stress-hypersensitive Wistar Kyoto (WKY) strain. Behavioural parameters were analysed in recorded videos. Animals were sacrificed 30 or 60 min after test completion. In various limbic areas, the relative mRNA levels of TRH, its receptors TRH-R1 and -R2, and its inactivating ectoenzyme pyroglutamyl peptidase II (PPII), were determined by RT-PCR, TRH tissue content by radioimmunoassay (RIA). The extent of the stress response was evaluated by measuring the expression profile of CRH, CRH-R1 and GR mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus and in amygdala, corticosterone levels in serum. As these tests demand increased physical activity, the

*Corresponding author. Tel.: +52 555 622 7632; fax: +52 555 622 7622.

E-mail address: joseph@ibt.unam.mx (P. Joseph-Bravo).

response of the HPT axis was also evaluated. Both tasks increased the levels of serum corticosterone. WKY rats showed higher anxiety-like behaviour in the DBT than Wistar, as well as increased PVN mRNA levels of CRH and GR. TRH mRNA levels increased in the PVN and TSH values remained unchanged in both strains although TRH content decreased in the medial basal hypothalamus of Wistar rats only. TRH content was measured in several limbic regions but only amygdala showed specific task-related changes after DBT exposure of both strains: increased TRH content. Expression of TRH mRNA decreased in the amygdala of Wistar, suggesting inhibition of TRHergic neuronal activity in this region. The participation of amygdalar TRH neurons in anxiety was confirmed in the EPM where TRH expression and release correlated with the number of entries, and the % of time spent in open arms, supporting an anxiolytic role of these TRH-neurons. These results contribute to the understanding of the involvement of TRH during emotionally charged situations and shed light on the participation of particular circuits in related behaviours.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is a three amino acid peptide isolated from the hypothalamus as the factor responsible for controlling pituitary thyrotropin (TSH) release (Boiler et al., 1969). The hypophysiotropic role of TRH is confined to neurons of the parvocellular paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus that project to the median eminence (Fekete et al., 2000). TRH is heterogeneously distributed throughout the central nervous system (CNS) as well as its two receptors (TRH-R1 and TRH-R2) (Lechan et al., 1987; Hokfelt et al., 1989; Sharif, 1989; Heuer et al., 2000) and the specific ectoenzyme that inactivates released TRH, pyroglutamyl peptidase II (PPII) (Vargas et al., 1987; Joseph-Bravo et al., 1998; Heuer et al., 2000).

The role of extrahypothalamic TRH has been inferred by pharmacological studies using TRH or its analogues that produce a wide array of effects in the CNS. These include increased arousal and locomotion, improved cognition and memory, as well as analeptic, antidepressive, antiepileptic, anxiolytic and neuroprotective effects (reviewed in Horita, 1998; Prokai, 2002; Gary et al., 2003). The effects of central administration of TRH into the lateral ventricles (ICV), or directly into specific brain regions, are not attributed to activation of the thyroid axis, supporting its central involvement in certain behaviours. For example, its arousal properties are related to the effect of TRH in septum and thalamus while in nucleus accumbens (N acc), TRH administration increases locomotion but blocks the locomotor sensitization produced by cocaine (Gary et al., 2003). In vitro, TRH modifies GABAergic and glutamatergic transmission in hippocampal and cortex slices (Stocca and Nistri, 1995, 1996). Anxiolytic-like effects of TRH were first demonstrated after its peripheral administration to rats exposed to a conflict test where it attenuates punishment behaviour (Vogel et al., 1980). Later, rats subjected to fear conditioning showed decreased acoustic startle and freezing responses after ICV TRH injection. In this later paradigm, no HPT activation was produced, but doubt was shed on a specific effect in reducing fear due to TRH effects on increased arousal and locomotion (Thompson and Rosen, 2000).

Evidence of direct involvement of specific TRHergic neurons in behaviour is scarce. Regulation of TRH and the elements involved in its transmission has been demonstrated in the hypothalamus–pituitary axis where a concerted modulation occurs (reviewed in Joseph-Bravo et al., 1998). Exposure to cold or suckling stimuli activates TRHergic hypophysiotropic neurons leading to TSH or prolactin secretion from the pituitary. Hypothalamic TRH mRNA levels increase within minutes (30–60 min) (Uribe et al., 1993; van Haasteren et al., 1996; Sánchez et al., 2001). Acting on the anterior pituitary, the released TRH causes decreased expression and activity of TRH-R1 (Yu and Hinkle, 1998; Sun et al., 2003), and of PPII (Joseph-Bravo et al., 1998; Vargas et al., 2002). In the CNS, trans-synaptic stimulation by electrical kindling produces, specifically in epileptogenic regions, increased TRH peptide and mRNA levels while, once kindling is established, decreased PPII activity and expression as well as TRH-binding and mRNA levels of TRH-R1 and TRH-R2 (Rosen et al., 1992; Kubek et al., 1993; de Gortari et al., 1995, 2006; Knoblach and Kubek, 1997). TRH content and TRH binding are differentially modified by diverse drugs of abuse (Jaworska-Feil et al., 1997; de Gortari et al., 2000a, 2005), antidepressants, or increased corticosterone levels (Pekary et al., 2004, 2006) supporting region-specific responses of TRH neurons to particular challenges.

Upon neural stimulation, whether in vivo or in vitro, TRH is released (Arancibia et al., 1983; Rondeel et al., 1989; Rosen et al., 1992) and concomitantly, TRH mRNA levels increase (Uribe et al., 1993, 1995; Pérez-Martínez et al., 1998; Sánchez et al., 2001; Cote-Vélez et al., 2005; de Gortari et al., 2006). In primary cultures of hypothalamic cells, PKA activation or noradrenaline stimulates TRH release and increases TRH mRNA levels, in 30 min, due to the fast response of induced CREB phosphorylation (Mayr and Montminy, 2001) that modulates TRH transcription (Cote-Vélez et al., 2005). Corticosterone also induces the transcription of the TRH gene without affecting its release, and increased cell content is detected at 120 min (Cote-Vélez et al., 2005). The time required for transcription, translation, and processing of neuropeptides has been estimated to take at least 60 min (Cheong et al., 2002; Harthoorn et al., 2002; Watts, 2005), but transport to the nerve terminal (5–7 mm/h) (Gainer and Chin, 1998) will vary

depending on the axon length of the particular efferents. Although stimulus-dependent transcriptional co-regulation of neuropeptide processing enzymes is observed in several conditions (Spijker et al., 2004; Perelló and Nillni, 2007), a fast regulation of their activity induced by the secretory stimulus has not been demonstrated; furthermore, granules increase their pH during exocytosis favouring loss of their contents but inhibiting processing enzymes (Han et al., 1999; Blackmore et al., 2001). Rat TRH protein precursor contains 5 repeated sequences of gln-his-pro-gly flanked by a pair of basic amino acid residues cleaved by convertases and carboxypeptidases; gln is cyclicized to pglu and TRH-gly is transformed to TRH upon the action of peptidylglycine α -amidating monooxygenase enzyme (PAM), proposed to be the rate-limiting step on TRH processing (Nillni and Sevarino, 1999). PAM requires as cofactors ascorbic acid and copper ion delivered into the secretory pathway (El Meskini et al., 2003) however, in acute situations such as cold exposure, the ratio of TRHgly/TRH is not altered (Perelló et al., 2007). Therefore, the existing evidence does not support an increased processing due to the secretory stimulus. As intracellular soluble peptidases do not degrade intra-granular TRH (Charli et al., 1987) an increase or decrease in TRH content at 30 min might be interpreted as decreased or increased release.

Thus, the activation of TRHergic neurons is reflected by changes in TRH mRNA, in the levels of the processed peptide and/or the expression of its receptors or in PPII activity and mRNA levels. This allows detection of events in which the activity of TRH neurons is regulated. We have recently shown the involvement of hippocampal TRH neurons in spatial learning and memory processes (Aguilar-Valles et al., 2007). The stress and/or activity induced by the Morris Water maze experience activates the HPT and HPA axes but, despite increased corticosterone levels, CRH expression is reduced in amygdala and that of TRH and BDNF is increased (Aguilar-Valles et al., 2005, 2007). CRH is an anxiogenic peptide (reviewed in Heinrichs and Koob, 2004; Schulkin et al., 2005) whose mRNA levels in amygdala are up-regulated by glucocorticoids and several types of psychological stress (reviewed in Bakshi and Kalin, 2000; Makino et al., 2002). Based on the anxiolytic role of BDNF (Koponen et al., 2004), TRH (Vogel et al., 1980; Thompson and Rosen, 2000), and of a cryptic peptide derived from pro-TRH (PPTRH 178–199) (McGivern et al., 1997), we hypothesized (Aguilar-Valles et al., 2005, 2007) that in situations demanding attention, there is an inhibition of anxiogenic pathways by the simultaneous activation of different neuronal systems (Poldrack and Packard, 2003).

The aim of the present work was to gain further insight into the possible anxiolytic-like role of TRH and of the response of central TRH neurons in anxiety tests. We first studied the effect of ICV TRH injection on the behaviour of Wistar rats subjected to the defensive burying paradigm (DBT). The DBT (Treit et al., 1981) evaluates anxiety-related behaviour in rodents by measuring a natural defence reaction (burying) to aversive stimulation as distinguished from general activity (number of rearings and probe explorations) (Rodríguez-Manzo et al., 1999; De Boer and Koolhaas, 2003). The response of TRH neurons was studied in two anxiety tests, the DBT and the elevated plus maze (EPM). In the DBT, we compared the response of the random

bred parental Wistar (W) rats with the inbred Wistar Kyoto (WKY) strain that has been used as a model of anxiety and depression (Rittenhouse et al., 2002), and exhibits a passive defensive behaviour in this test (Paré, 1992). Only Wistar rats were tested in the EPM to further discriminate general activity from anxiety-like behaviours. This paradigm causes mild anxiety as it produces a conflict between the innate desire of rodents to explore novel environments and their fear of open spaces (Pellow et al., 1985).

Due to the stressful nature of these tests, the neuroendocrine response was evaluated by measuring the activity of HPA axis quantifying serum corticosterone concentrations as well as the relative mRNA levels of CRH, CRH-R1, and the glucocorticoid receptor type II (GR) (Herman et al., 2005). HPT axis activity was evaluated due to the inhibitory effect of certain types of stress (Pacák and Palkovits, 2001), and the relevance of thyroid hormones on behaviour (Lifschytz et al., 2006), measuring the concentration of serum TSH and basal-hypothalamic TRH, and mRNA levels of proTRH in the PVN. As the amygdala is a key structure in the processing of information with emotional value and is the epicentre of associated behavioural responses (Phelps and LeDoux, 2005), the expression of stress responsive genes was determined in this region (reviewed in Makino et al., 2002; Herman et al., 2005) together with TRH expression in order to determine the response of TRH neurons in anxiety. The elements involved in its transmission (relative mRNA levels of TRH receptors and PPII) were measured in Wistar rats subjected to EPM. TRH content was also quantified in other brain regions to evaluate if the activity of TRH neurons in other areas is affected by fear, anxiety, or behaviours related to the tests used. Animals were sacrificed soon after test completion (30–60 min) when increased levels of TRH mRNA can be detected after neuronal stimulation (Uribe et al., 1993; Cote-Vélez et al., 2005) but prior to the time required for translation, processing, and transport.

2. Methods

The DBT was performed at the facilities of the CINVESTAV and the EPM, at the Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM). In both cases, rats were maintained for at least 4 weeks in a temperature-controlled (22 °C) room with inverted 12 h light–12 h dark cycle (lights on at 1900 h; evenly illuminated with white halogen lamp, 32 W) in a temperature-controlled (22 °C) with free access to food (Harlan 2018S) and water. Experiments were performed in a special room with dim light (red bulb, 30 W, placed behind a Hansa safe light glass #1), near the rat's home room where they were returned after the trial. Rats were sacrificed, at the times stated for each paradigm, in a special room across the hall (also under dim light). The time of transport from the home to the sacrifice room was less than 1 min and the number of animals in each trial was calculated such that the total experiment concluded in less than 2 h in order to avoid biochemical or behavioural changes due to circadian rhythms. All behavioural protocols started at 1000 h (3 h after light was on). Experimental procedures were performed in accordance with the Mexican official norm for animal care and handling (NOM-062-ZOO-1999) following the guidelines of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of

Laboratory Animals. Efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used.

2.1. Defensive burying test (DBT)

Male Wistar and WKY rats (250–300 g) bred in the animal facilities of the Department of Pharmacobiology (CINVESTAV, Mexico City), were housed in groups of ten in polycarbonate cages (50 × 40 × 20 cm³). Experiments were approved by the Ethics Committee of the CINVESTAV.

DBT is an experimental paradigm for rodents commonly used for the pharmacological screening of anxiolytic drugs (Treit et al., 1981; De Boer and Koolhaas, 2003). The animal was placed in a Plexiglas test chamber (46 × 44 × 30 cm³) filled with 5 cm-deep bedding material for 10 min. A removable probe was introduced through a hole made in the narrower side of the box, 2 cm above bedding; the probe (Teflon bar of 7 cm surrounded by copper wire connected to a shock-generator scrambler [La Fayette Instruments Co., model 5806]) provided a shock (0.3 mA) when touched. Once the animal receives its first shock, it typically recognizes it as an aversive stimulus and pushes a pile of bedding material toward the probe with rapid alternating movements of its forepaws; burying behaviour is considered a form of active avoidance, the most important behavioural parameter is the cumulative time spent by the animal burying the electrode; a decrease in burying time reflects anxiolytic-like effects (Treit et al., 1981; Menard and Treit, 1999; De Boer and Koolhaas, 2003).

To rule out the effects of novelty, animals were transported to the experimental room and placed in the cage (without the probe) for 10 min for each of 3 days prior to testing. Behaviour was videotaped during the complete trial. The anxiety-like behaviour was assessed as outlined by Treit et al. (1981). The behavioural parameters were: cumulative time the animals spent burying the probe, latency to bury (considered to reflect reactivity), immobility (time spent staring at the electrified probe), total number of shocks, number of probe explorations without receiving a shock (indirect measure of fear), and the number of rears (markers of general activity) (Rodríguez-Manzo et al., 1999; De Boer and Koolhaas, 2003).

2.1.1. Effect of TRH administration

To test the effects of TRH ICV administration on anxiety-like behaviour, 14 adult male Wistar rats (286–352 g) were anesthetized by IP injection of 100 mg/kg of ketamine (AnesketTM) and 20 mg/kg xylazine (RompunTM), and stereotaxically (ASI Instruments) implanted with a stainless steel cannula placed above the left lateral ventricle (AP: -0.8, DV: 2.8 and L: 1.2), containing a removable stylet to avoid obstruction. After surgery, animals were kept in individual cages for a 10-day recovery period during which they had free access to food and water. Appearance, behaviour and wound healing were visually checked daily and stylet position was manually checked.

After the 3 days of habituation (see above), TRH (Bachem) (12.4 µg in 5 µl saline), or the equivalent volume of normal saline, was infused at 1000 h over 2 min (Kd Scientific mini pump) into freely moving animals. After injection, the stylet was replaced and animals returned to their individual home

cages. Twenty minutes after TRH or saline injection, animals were tested for defensive burying as described above and their behaviour recorded. Animals were sacrificed by decapitation 30 min after DBT and trunk blood collected.

2.1.2. Effect of DBT on TRH and CRH neuronal activity

In these series of experiments, male Wistar (W) and the normotensive WKY (Redei et al., 2001) rats (300–350 g) were habituated as described above. On the day of the experiment, a group of habituated animals was sacrificed directly from their home room (habituated control = HabC), a second group was placed in the chamber for 10 min with the probe (stimulated group: DBT+) and a third, without the probe (yoked group: Y). Y and DBT+ groups were then transported to a separate room for 30 or 60 min and then, individually transferred to a contiguous room for sacrifice. Naïve (N) animals from the same lot were sacrificed simultaneously to assess the effects of habituation. Results for each strain were calculated as percentage of the corresponding control groups (Hab C or Yoked, as stated) and pooled for statistical analysis.

2.2. Elevated plus maze (EPM)

The EPM (San Diego Instruments Co.) consisted of 4 arms (50 × 10 cm², opaque black acrylic) aligned in a cross position, elevated 70 cm above the floor. The animal was initially placed in the centre of the maze (10 × 10 cm²) and left to explore it during 5 min. Two of the opposing arms had side and end walls 50 cm high (closed arms, CA), thus considered the safe zone of the maze. The small rim of the open arms (OA) present in the commercial apparatus was removed in order to augment the anxious behaviour. Anxiety is measured as decreased time and/or number entries to the OA in comparison to the CA. (Pellow et al., 1985; Rodgers and Dalvi, 1997; Carobrez and Bertoglio, 2005).

Male Wistar rats (250–300 g) bred in the animal facility of the Instituto de Biotecnología (UNAM) were housed in groups of four in polycarbonate cages (23 × 47 × 20 cm³). Experimental procedures were approved by the Institute's Bioethics Committee.

Rats were tested in the EPM, without previous manipulation. Behaviour was video-recorded and quantified using specialized software (SMART 2.5). Entering an arm was defined when the 4 paws were on the arm; leaving the arm, when at least the two forepaws exited it. Scored behaviours were: percentage of entries to OA or to closed arm (CA); percentage of time spent in the OA or CA. As indexes of general activity: the number entries to CA (Rodgers and Dalvi, 1997), and the time spent and total number of entries to all arms. After 5 min of spontaneous exploration of the maze, rats were transported to a separate near-by room to rest in their home cages for 30 min and then sacrificed. N rats taken from their home room were sacrificed at the same time interval.

2.3. Biochemical assays

Brains were carefully removed intact and placed on dry ice (stored at -70 °C), except in the EPM experiments, where the median eminence (containing part of the arcuate

nucleus) was dissected, immediately after the brain was excised. Serum was separated by centrifugation (10,000g, 20 min at 4 °C) and kept in aliquots at –20 °C for hormone determinations. Frozen brains were manually dissected making coronal thick slices following [Palkovits and Brownstein atlas \(1988\)](#) as described ([Aguilar-Valles et al., 2005](#)) except for the EPM groups, where a 2 mm diameter micropunch (Fine Science Tools) was used to dissect the amygdala, and a 1 mm micropunch for the PVN (PVN from a slice: Bregma –1.5 to –2.1).

2.3.1. TRH determination

TRH was quantified in brain tissue by radioimmunoassay (RIA) as described ([de Gortari et al., 1995](#)). Briefly, frozen tissues were homogenized in 500 µl 20% acetic acid and centrifuged for 10 min at 12,000g, at 4 °C. Cold methanol was added to the supernatant (65% final concentration) and left overnight at –20 °C followed by 15 min centrifugation at 12,000g at 4 °C. The supernatant was evaporated in a speed vacuum concentrator (Savant) and sediments suspended in RIA buffer (0.05 M phosphate buffer pH 7.5, 0.25% bovine serum albumin (Sigma), 0.15 M NaCl (J.T Baker)) to quantify TRH in triplicates (10% inter assay, 5% intra assay variability). As TRH is confined in defined regions ([Hokfelt et al., 1989](#)) dissections included some surrounding tissue. TRH content is reported for the total region (as in [de Gortari et al., 2000a](#); [Aguilar-Valles et al., 2007](#)) since normalized to mg of protein ([Lowry et al., 1951](#)) results in a higher variability in regions like amygdala or frontal cortex (i.e. 393 ± 85 pg vs. 100 ± 48 pg/mg protein in frontal cortex).

2.3.2. Serum hormone levels

All hormones were quantified by RIA using commercial reagents. For TSH, first antibody and antigen were purchased from NIDDK-USA, and 100 µl of 1:3 dilutions of serum in RIA buffer used for each determination. To quantify corticosterone, reagents from ICN Biomedicals (Aurora, OH, USA) were used and serum was previously diluted in the assay buffer (0.01 M phosphate buffer pH 7.5 with 0.1% gelatin from calf skin [RPI Corp.] and 0.15 M NaCl). Thyroxine (T4) was quantified with reagents and protocol from Diagnostic Products Corporation. Maximum inter-assay variability of all RIAs was 10% and intra-assay, 5.4%. All samples were assayed in duplicate or triplicate and their mean taken as one determination.

2.3.3. Semiquantitative RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from frozen tissues by sonication (Ultrasonic homogeneizer 4710, Cole Palmer, Vernon Hill, IL, USA) in 4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate, pH 7, 0.5% sarcosyl, 0.1 M β-mercaptoethanol, as described previously ([Chomczynski and Sacchi, 1987](#)). RNA quality was verified by gel electrophoresis; samples showing a ratio of 28S:18S ribosomal RNA, or of 260/280 nm absorbance units < 1.5, were repurified or discarded.

One microgram of RNA was transcribed with M-MLV reverse transcriptase and oligo-dT as previously reported ([Pérez-Martínez et al., 1998](#)). PCR reactions were performed as described ([Aguilar-Valles et al., 2005](#), [de Gortari et al., 2006](#)). Briefly, 50 µl final volume contained: 5 µl buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 µg/ml gelatin),

2.5 µl of 30 mM MgCl₂, 1 µl of 10 mM deoxynucleotides, 1 µl of sense and antisense specific oligonucleotides (25 pmol of pro-TRH, TRH-R1, TRH-R2, pro-CRH, CRH-R1 or GR and 50 pmol for cyclophilin and G3PDH primers) and 2.5 U Taq DNA polymerase (Biotecnologías Universitarias, UNAM, DF, México). Sequences for PCR oligonucleotides were designed using the Oligo software (V. 4.3; National Biosciences Inc., Plymouth, MN, USA) to avoid formation of secondary structures or dimers; specificity was verified using the BLAST NCBI program as described ([Aguilar-Valles et al., 2005](#); [de Gortari et al., 2006](#)). Adequate linear range of amplification for each probe was verified by amplifying each cDNA (from 1 µg RNA) with different number of PCR cycles (Mastercycler, Eppendorf, Hamburg, Germany) and at least 3 serial dilutions of cDNA as described ([Aguilar-Valles et al., 2005](#); [de Gortari et al., 2006](#)). For example, final conditions of amygdala cDNAs: cyclophilin, 4 µl of cDNA and 20 cycles; pro-TRH, 6 µl and 28 cycles; TRH-R1, 6 µl and 29 cycles; TRH-R2, 6 µl and 32 cycles. PCR final conditions were: 95 °C for 1 min followed by 1 min at 64 °C for pro-TRH, TRH-R1 and cyclophilin. At the end of the PCR, all samples were incubated for 10 min at 72 °C for a final extension. Products were separated by gel electrophoresis (2% agarose), stained with ethidium bromide, and band intensity quantified with a Fluor-S Multimager (BioRad). Care was taken to include all experimental groups in each gel. The relative values of mRNAs were calculated as the ratio of each cDNA to cyclophilin or G3PDH cDNA. The stability of these cDNA markers was evaluated running in the same gel, TRH, cyclophilin and G3PDH cDNAs; variation in TRH expression were similar using the ratio of either control and no changes were observed in the ratio of G3PDH/cyclophilin. Most cDNAs were calculated against cyclophilin cDNA ran in the same gel, except for CRH-R1 cDNA as it runs near that of cyclophilin cDNA.

2.3.4. Statistics

Assays performed in duplicate or triplicate from the same animal were taken as one determination. Results of at least two independent experiments (usually 4–6 rats/group) were calculated as percent of controls and pooled. One way ANOVA was performed to compare changes between different groups at independent times of sacrifice; when significant, it was followed by a Fisher's PLSD post hoc analysis to identify differences. Significance was considered when $p < 0.05$. Linear correlation analyses were considered significant when the multiple R value (r) was > 0.6 and p value < 0.05 .

3. Results

3.1. Defensive burying test

3.1.1. Effect of TRH ICV injection on behaviour

The dose used (12.4 µg) was chosen due to its effects in the contextual fear conditioning test ([Thompson and Rosen, 2000](#)). TRH administration reduced the time spent burying the electrode, and a tendency to increase latency, compared to saline (sal) injected animals ([Figure 1A](#)). Since general exploratory behaviour (sal or TRH: 20 ± 1), number of electrode approaches (sal: 5 ± 2 , TRH: 6 ± 1) and number

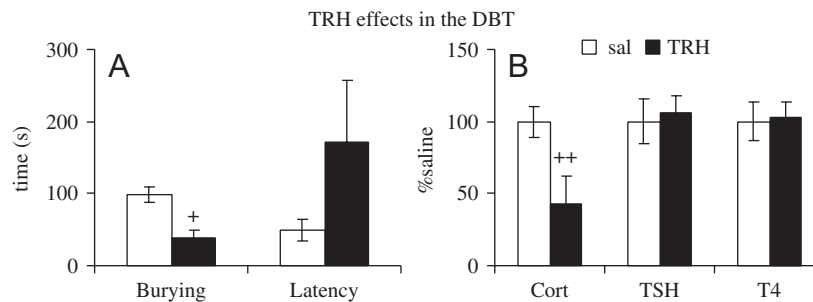


Figure 1 Behavioural and endocrine effects of TRH administration in the DBT. TRH (12.4 $\mu\text{g}/5\ \mu\text{l}$ saline) was injected ICV into Wistar rats; controls received an equivalent volume of saline (sal). (A) Time spent burying the electrode of Wistar male rats during the 10 min of the DBT ($^+p = 0.004$, student *t*-test), and latency to start burying the probe ($n = 7$). (B) Serum levels of corticosterone (Cort) (sal: 229 ± 31 , TRH: 97 ± 19 ng/ml), thyrotropin (TSH) (sal: 1.6 ± 0.2 , TRH: 1.7 ± 0.2 ng/ml) and thyroxine (T4) (sal: 3.4 ± 0.4 , TRH: 3.5 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{dl}$); values (obtained 30 min after DBT) are expressed as % of control values (sal) calculated as the mean \pm standard error. $^{++}p = 0.003$, student *t*-test; $n = 7/\text{group}$.

Table 1 Behavioural parameters of Wistar and Wistar Kyoto rats exposed to the defensive burying test (DBT).

	Wistar	Wistar Kyoto
Latency	70 ± 13	95 ± 29
Burying time	187 ± 30	$71 \pm 15^*$
Immobility time	18 ± 4.5	$41 \pm 8.5^*$
Number of shocks before	5 ± 1	$2 \pm 0.2^{**}$
Number of shocks after	8 ± 2	$2 \pm 0.5^*$
Total shocks received	13 ± 2	$4 \pm 0.5^{**}$
Air explorations	17 ± 1	$11 \pm 1^{**}$
Electrode explorations	7 ± 1	$2 \pm 0.5^{**}$

$n = 30$ W or 20 WKY. Data are expressed as the mean \pm standard error. $^*p < 0.005$, $^{**}p < 0.0005$ *t*-test.

of shocks received during the test (sal: 5 ± 1 , TRH: 6 ± 1) were similar in both groups, the effect on burying time represents a specific emotional response. TRH injection also diminished the stress response of the animals since, compared to saline injected, serum corticosterone levels were diminished 30 min after the trial (Figure 1B). As the thyroid axis was not activated (Figure 1B), the effects of TRH on behaviour did not involve its endocrine targets.

3.1.2. Comparison of W and WKY behavioural response in the DBT

The behavioural response to the DBT differed among strains (Table 1). Wistar (W) rats spent more time burying than WKY, but the latter presented lower general activity (air or electrode explorations) and longer immobility time (Table 1). There was no difference between strains in the latency to start burying the electric probe. WKY received less number of shocks (total, before or after the display of the defensive behaviour, Table 1). The passive behaviour of the WKY coincided with previous reports showing that this strain tends to avoid the electrified probe (Paré, 1992) and displays hypoactivity, high sensitivity, and immobility in tests of emotional behaviour (Baum et al., 2006).

3.1.3. Neuroendocrine response

Naïve rats (N) showed lower serum corticosterone levels than habituated controls (Hab C) or yoked (Y) Wistar rats; exposure to the electrified probe (DBT+) caused a higher increase ($N = 172 \pm 62$ ng/ml; Hab C = 368 ± 128 ; Y = 351 ± 55 , DBT+30 min = 580 ± 111 ng/ml; $n = 10$ – $15/\text{group}$. ANOVA: $F_{5, 65} = 7.014$, $p < 0.0001$); values normalized at 60 min (Figure 2A). Corticosterone levels of DBT+ Wistar did not correlate with behavioural parameters. Compared to Wistar, N WKY rats had higher corticosterone values (360 ± 62 ng/ml) and did not differ from either Hab C or DBT+ (Figure 2B); however, the levels at 30 min varied positively with the number of shocks received ($r = 0.624$, $p = 0.04$, $n = 10$) and negatively with the number of electrode explorations ($r = -0.66$, $p = 0.03$) and burying time ($r = -0.63$, $p = 0.05$; individual values not shown).

Despite the apparent failure of the WKY rats to increase corticosterone levels in response to DBT exposure compared to Y, CRH and GR mRNA levels increased (at 30 min) in the dorsal hypothalamus (dHPT) (Figure 2B) ($F_{3, 13} = 11.567$, $p = 0.0004$ [CRH], $F_{3, 13} = 7.894$, $p = 0.003$ [GR]) while no significant changes were detected in W rats (Figure 2A).

TSH and T4 serum concentrations were similar in both strains and there were no significant effects of Y or DBT+ to either Hab C or N (Figure 2C and D) (W: $N = 1.22 \pm 0.2$ ng/ml, ANOVA: $F_{5, 42} = 0.926$, $p = 0.47$ and WKY: $N = 1.65 \pm 0.3$ ng/ml, ANOVA: $F_{5, 42} = 1.642$, $p = 0.061$). The hypothalamic response however differed. In Wistar rats, TRH content in the medial basal hypothalamus (MBH) decreased in DBT+ compared to Y and Hab C (ANOVA: $F_{4, 72} = 3.866$, $p = 0.007$) while TRH mRNA levels increased in the dHPT of DBT+ compared to Y, at 30 and 60 min (Figure 2C) (ANOVA: $F_{3, 38} = 3.549$, $p = 0.023$) suggesting activation of TRH neurons. In contrast, variations in WKY were observed only at 30 min: increased TRH content in MBH compared to Hab C and Y (suggesting decreased release), and increased TRH mRNA in dHPT vs. Y (Figure 2D) (ANOVA: TRH (pg): $F_{4, 41} = 3.019$, $p = 0.029$; TRH mRNA: $F_{3, 27} = 16.655$, $p < 0.0001$) pointing for dissociation between synthesis and release or activation of non-hypophysiotropic TRH neurons whose terminals reside outside the dissected area.

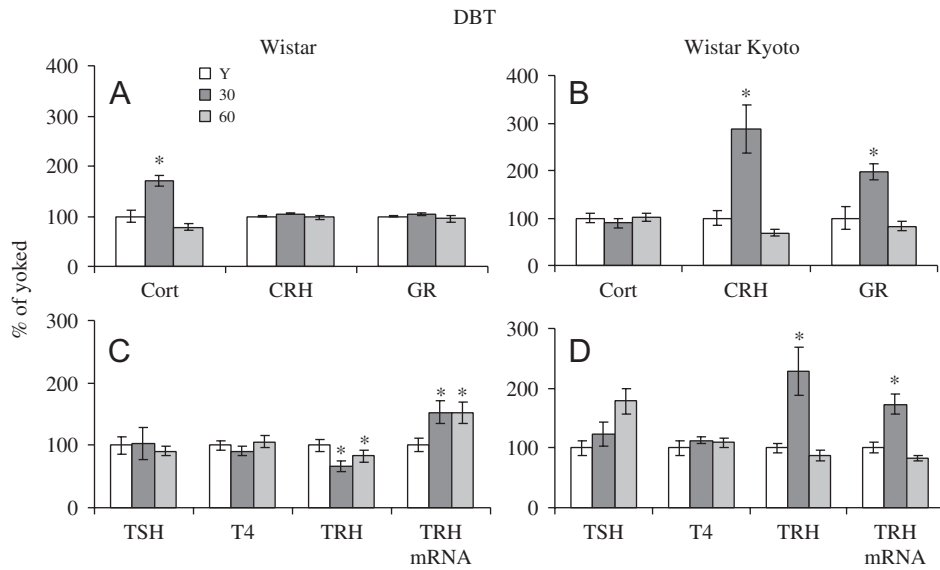


Figure 2 Neuroendocrine response of Wistar and WKY rats following 10 min DBT. HPA axis: serum corticosterone concentration, CRH and GR mRNA relative values in dorsal hypothalamus of Wistar rats (A) or WKY (B) sacrificed 30 or 60 min post DBT. HPT axis: serum thyrotropin (TSH) or thyroxine (T4) concentrations, TRH content in medial-basal hypothalamus and TRH mRNA relative values in dorsal hypothalamus of W (C) or WKY (D). Values are calculated as percent of Y animals and expressed as the mean \pm standard error of three independent experiments for W and two for WKY. *ANOVA: $p < 0.05$ vs Y controls; $n = 15$ rats (W); 10 (WKY).

Table 2 TRH content (pg/tissue) in brain regions of Wistar and Wistar Kyoto habituated control rats.

	Wistar	Wistar Kyoto
MBH	5132 \pm 225	9161 \pm 1600
Amygdala+Pir. Cx.	1187 \pm 148	5072 \pm 536
N. Accumbens	1216 \pm 94	1515 \pm 178
Frontal cortex	448 \pm 11	744 \pm 144
Post. Hippocampus	359 \pm 67	1114 \pm 180
Septum	1529 \pm 217	913 \pm 85

Data are expressed as the mean \pm standard error. $n = 15$ W or 10 WKY. Abbreviations: MBH, medial basal hypothalamus including median eminence and arcuate nucleus; Pir. Cx, piriform cortex; Post., posterior.

3.1.4. Variations in TRH content of limbic areas

TRH was quantified in several brain regions of hab C, Y and DBT+ W and WKY rats, sacrificed 30 and 60 min after test completion. TRH levels of Hab C in amygdala, posterior hippocampus, frontal cortex and MBH were higher in WKY than in Wistar, while the opposite was observed in septum (Table 2).

The DBT increased TRH levels in amygdala of both strains (Figure 3A and B) (ANOVAs: Amygdala, $F_{4, 60} = 4.707$, $p = 0.002$ [W] and $F_{4, 42} = 3.132$, $p = 0.02$ [WKY]). A tendency to increase was observed in frontal cortex of WKY (significant only by t -test Y vs. DBT+ 30 or 60 $p = 0.05$). Values in frontal cortex of DBT+ Wistar rats were similar to Y, but higher than those of HabC at 60 min (W: Hab C = $100 \pm 10\%$, Y = $451 \pm 90\%$, DBT+ = $339 \pm 80\%$; ANOVA: $F_{4, 74} = 8.401$, $p < 0.0001$).

The posterior hippocampus showed decreased TRH levels in DBT+ of Wistar rats compared to Y at 60 min (Figure 3A) or to Hab C (Hab C = 100 ± 10 ; Y = 194 ± 18 ; DBT+ = 64 ± 18 ;

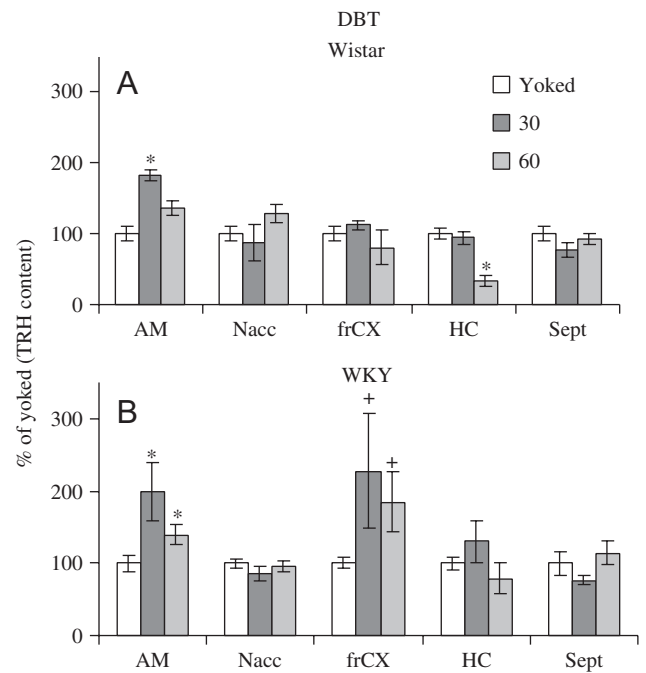


Figure 3 TRH content in limbic regions of Wistar (A) and WKY (B) rats sacrificed 30 and 60 min after the DBT. Abbreviations: Amygdala-piriform cortex (AM), nucleus accumbens (N acc), frontal cortex (frCX), posterior hippocampus (HC) and septum (Sept). Values are calculated as percent of Y groups and expressed as the mean \pm standard error of independent experiments; $n = 15$ for W and 10 for WKY. *ANOVA: $p < 0.05$ vs Y controls. +student t -test: $p < 0.05$.

ANOVA $F_{4, 45} = 12.929$, $p < 0.0001$). No significant changes were observed in the N acc or septum of either strain (Figure 3A and B). Despite that TRH is present in all the

regions studied (Hokfelt et al., 1989; Heuer et al., 2000), involved in anxiety and stress circuits (Makino et al., 2002; Herman et al., 2005; Phelps and LeDoux, 2005), the only region showing specific response to the DBT test in both strains was amygdala.

3.1.5. Gene expression profile

Relative mRNA levels were analysed in the amygdala of Y and DBT+ groups. TRH mRNA levels decreased after 30 and 60 min in the amygdala of W (Figure 4A; $F_{3, 39} = 3.541$, $p = 0.023$); together with the increased TRH tissue content (Figure 3A), these results point for inhibition of TRH neurons. In contrast, TRH mRNA levels were increased in the WKY strain at 60 min (Figure 4B; $F_{3, 29} = 4.774$, $p = 0.008$). CRH mRNA levels increased only in the Wistar strain after 30 min of DBT exposure (Figure 4A and B) (ANOVA: $F_{3,30} = 2.987$, $p = 0.046$ (CRH)); a tendency to increase was observed also for GR (significant only with t -test).

Due to the decrease in TRH content in hippocampus of W rats compared to Y and Hab C (Figure 3A), its mRNA levels

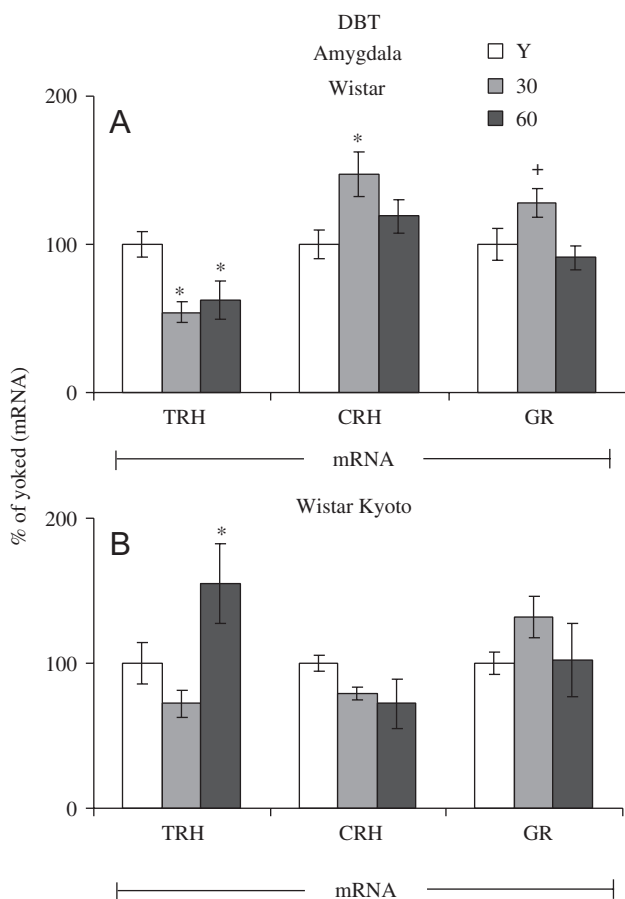


Figure 4 Gene expression profile in amygdala of W (A) and WKY (B) rats tested in the DBT. Relative mRNA levels of TRH, CRH and GR in amygdala-piriform cortex of animals sacrificed at 30 or 60 m post DBT. Values are calculated as percent of Y groups and expressed as the mean \pm standard error of independent experiments; $n = 15$ for W and 10 for WKY. *ANOVA: $p < 0.05$ vs Y controls. +student t -test: $p < 0.05$. mRNA relative levels were measured by RT-PCR.

were also determined in the same groups. Only Y animals showed a small but significant increase (Hab C: 100 ± 10 , Y = $148 \pm 16^*$, DBT+ = 128 ± 4 ; ANOVA: $F_{4, 23} = 2.681$, $p = 0.057$, Hab C vs. Y $p = 0.006$, $n = 7$).

3.2. Elevated plus maze

Wistar rats were submitted to the EPM for 10 min, 3 h after the beginning of the dark phase. Behavioural parameters measured as anxiety scores were: time spent in OA: 104 ± 28 s, # of entries to OA: 10 ± 2 ; % of time in OA: 35 ± 9 ; % entries to OA: 36 ± 7 . As index of total activity: total number of entries to both arms (total entries): 28 ± 2 , time spent in CA: 140 ± 24 ; # of entries to CA: 18 ± 4 . The time spent in the centre was 356 ± 24 s.

3.2.1. Neuroendocrine response

Corticosterone serum levels increased but CRH, CRH-R1, or GR mRNA levels in the PVN did not vary (Figure 5A). There was no correlation between corticosterone concentration or CRH mRNA levels and % of time (Figure 5B) or # of entries to OA, neither to CA or to total entries to CA (total activity) (not shown), nor between corticosterone and CRH mRNA levels ($r = -0.450$, $p = 0.262$). GR expression presented a U-shaped curve against anxiety (% of entries into OA) (Figure 5C).

TRH content decreased in the median eminence (ME) (t -test N vs. EPM30 $p = 0.007$) but despite this apparent increased release, TSH values were not altered by exposure to the EPM (Figure 5D). TRH mRNA levels were not affected either. TRH levels correlated negatively with the total time spent in both arms suggesting that higher the activity of the animal, higher the release of TRH (Figure 5E; $r = -0.817$, $p = 0.013$).

3.2.2. Response of the amygdala

There was a trend to increase CRH and CRH-R1 mRNA levels that did not achieve significance (Figure 6A). CRH-R1 mRNA levels correlated negatively with activity (total number of entries to all arms) (Figure 6B; $r = -0.805$, $p = 0.05$). The mRNA levels of CRH tended to associate positively with the number of entries to CA ($r = 0.756$, $p = 0.081$) and presented a U shaped relationship with % of entries to OA (Figure 6C). CRH mRNA levels in amygdala did not correlate with corticosterone values.

The levels of TRH or TRH-mRNA did not vary, while TRH-R1 expression significantly diminished (Figure 6D). However, TRH mRNA levels correlated, positively with the % of entries to OA (Figure 6E) ($r = 0.97$, $p = 0.006$), and not with the number of entries to CA ($r = 0.47$, $p = 0.34$). TRH-R1 mRNA values were not associated with any behavioural parameter, nor with TRH mRNA levels (not shown).

These data suggest that activation of TRHergic neurons in the amygdala is not associated with the activity index (total entries into CA) but with more explorations and time spent in OA, reflecting less anxiety.

4. Discussion

An anxiolytic-like effect of ICV TRH administration to animals submitted to the defensive burying paradigm was

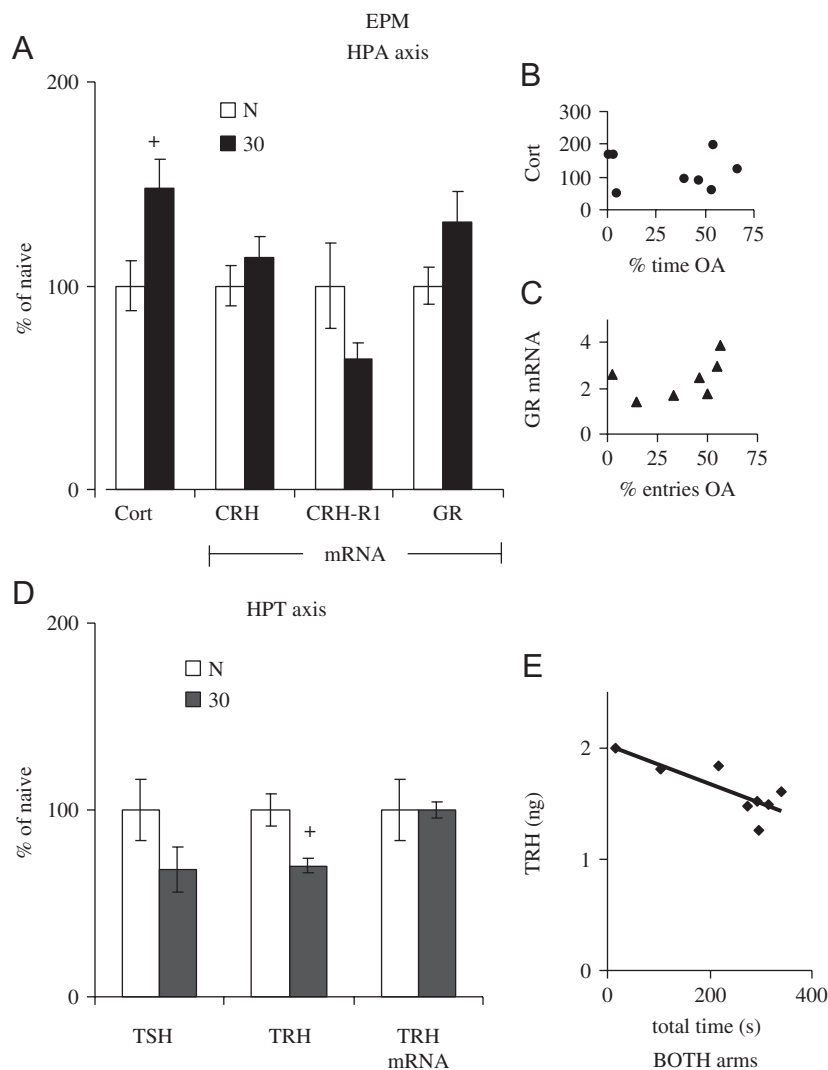


Figure 5 Neuroendocrine response of rats placed on the Elevated Plus Maze (EPM). (A) HPA axis response: serum corticosterone (Cort) concentration, relative mRNA levels of CRH, CRH-R1 and GR in the PVN of Wistar male rats. (B) Regression analysis between % of time in OA and corticosterone levels. (C) Regression analysis between % of entries to OA and the relative mRNA levels of GR in PVN. (D) HPT axis response: TSH serum concentration, TRH content in median eminence-arcuate nucleus (ME), relative levels of TRH mRNA in PVN. (E) Regression analysis between total time in both arms and TRH content in ME. (A) and (D) are calculated as % of the naïve (N) group and expressed as the mean \pm standard error. +student *t*-test: $p < 0.05$; ($n = 8$ /group).

demonstrated by a diminished time burying the electrified probe, a longer latency period, and reduced corticosterone-stress response. This paradigm allows analysis of general motor activity simultaneously but independently from fear-anxiety-related behaviours (Rodríguez-Manzo et al., 1999; De Boer and Koolhaas, 2003). Locomotion activity and perception of noxious stimuli seemed unaffected as TRH and saline injected animals received an equal number of shocks, before and after the display of the anxiety-related behaviour, as well as similar exploratory behaviour and approaches to the electrode. As previously reported (Thompson and Rosen, 2000), the thyroid axis was not affected supporting the suprahypothalamic role of TRH in diminishing fear/anxiety-related responses.

To get some insight into the forebrain loci of TRH anxiolytic-like effects, TRH levels were quantified in regions involved in the stress circuit of Wistar and WKY rats subjected

to the DBT (Treit et al., 1981). In both, the relationship between anxiety and the activity of TRHergic neurons was evident only in the amygdala. This was corroborated using the EPM (Pellow et al., 1985) that allows the evaluation of the state of the animal's anxiety. As the amygdala plays a significant role in mediating behavioural and emotional consequences of stress (Makino et al., 2002; Herman et al., 2005; Phelps and LeDoux, 2005), it was important to verify if the magnitude of the stress response reflected in the activity of the HPA axis and its effects on the HPT axis, and how these correlated with the behavioural parameters measured.

4.1. Response of the HPA axis

The HPA axis is immediately activated in response to stress, increasing corticosterone release within minutes

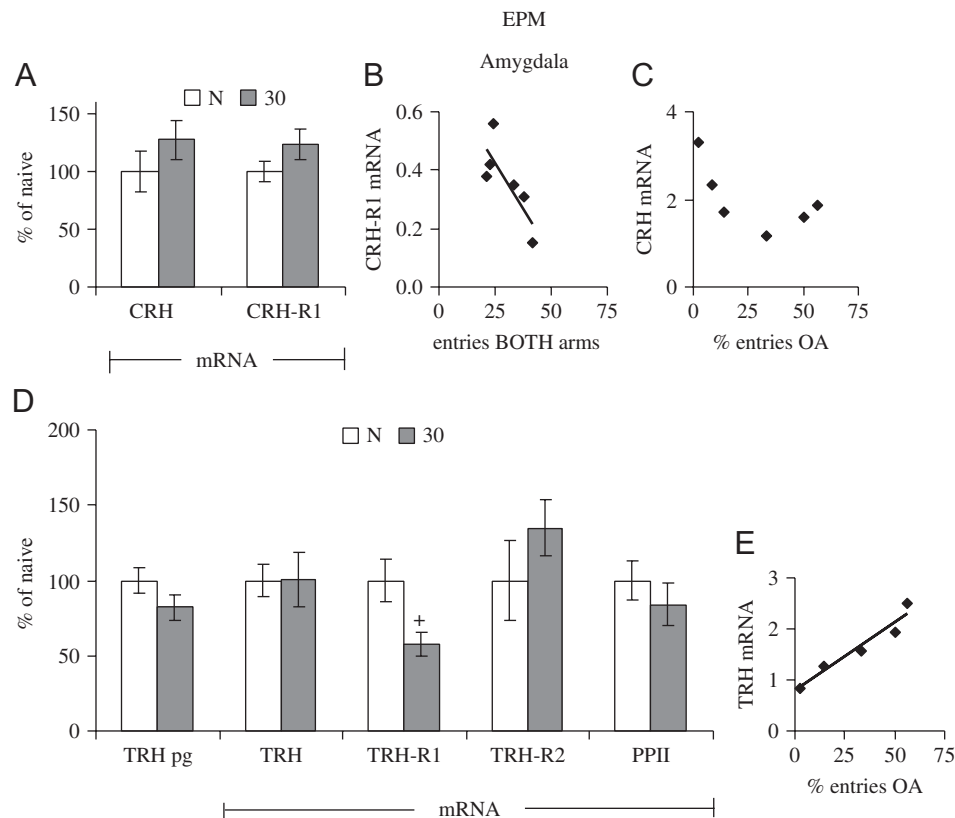


Figure 6 Expression profile in amygdala of rats placed on the Elevated Plus Maze (EPM). (A) Relative mRNA levels of CRH, CRH-R1 of Wistar rats sacrificed 30 min after test completion. Values are calculated as % of the naïve (N) group and expressed as the mean \pm standard error ($n = 8$ /group). (B) Correlation between CRH-R1 mRNA and entries to both arms. (C) U-shaped curve related % entries to OA to relative CRH mRNA. (D) TRH content, relative values of TRH, TRH-R1, TRH-R2 and PPII mRNA of rats sacrificed 30 min post-test. Values are calculated as in (A). (E) Correlation between % of entries to OA and TRH mRNA relative values. + t -test: $p < 0.05$.

(Herman et al., 2005). Enhanced corticosterone levels of Wistar rats exposed to the DBT or the EPM confirmed the stressful nature of these tests (Figures 2A and 5A). The dynamics of CRH expression increase in the PVN depends on the nature and strength of the stressor (Pacák and Palkovits, 2001; Makino et al., 2002; Herman et al., 2005); a rise in the levels of CRH heteronuclear (hn) RNA is more easily detected than those of CRH mRNA which are evident, at short times, only after highly stressful conditions (Kovács and Sawchenko, 1996; Watts, 2005). Consistent with the stress hyper-responsiveness that characterizes the WKY strain (Paré, 1992; Rittenhouse et al., 2002), animals displayed a higher immobility than W. CRH expression in the dorsal hypothalamus (that includes the PVN) of WKY was significantly increased after 30 min in DBT+ compared to Y animals; as no difference was observed in basal CRH mRNA levels between the two strains, the lack of increase in corticosterone levels of WKY reflects the previously described decreased glucocorticoid-feedback responsiveness of WKY-corticotrophs (Figure 2A and B; Hauger et al., 2002).

GR mediates the effects of stress-induced increase in corticosterone; its expression is down-regulated in hypothalamus by glucocorticoids, chronic stress, or after a strong acute stress (Makino et al., 2002; de Kloet et al., 2005); upregulation however is observed after acute restraint stress (Karandrea et al., 2000; García-Vázquez et al.,

2006). A transient increase in GR mRNA levels was detected in the dorsal hypothalamus of WKY (Figure 2B). Due to the short times studied, this increase is most probably due to neuronal activation (Han et al., 2007) affecting either transcription or stability of GR mRNA.

In contrast to the DBT, which provokes anxiety/fear, the EPM test allows the endogenous neuronal and hormonal systems to respond to a milder form of stress (Rodgers et al., 1997) and correlate their changes with behaviour. Increased corticosterone levels were observed after exposure to the EPM but not in the expression or CRH, CRH-R1 or GR. These values did not correlate with anxiety. The U-shaped relationship between GR expression in the PVN and the % of entries to OA (Figure 5C), resembles that reported for glucocorticoid levels in various paradigms where excessively low or high levels preclude appropriate behaviours (de Kloet et al., 2005).

4.2. Response of the HPT axis

The thyroid axis plays a primordial role in energy homeostasis (Flier et al., 2000; Joseph-Bravo, 2004) and is activated not only by cold exposure but also for example, by exercise (Scheen et al., 1998; Aguilar-Valles et al., 2007) whereas it is inhibited by chronic or a strong acute stress

exposure (Pacák and Palkovits, 2001). The activity of the HPT axis, evaluated by TSH or T4 serum levels, was neither affected by DBT nor by the increased locomotion caused by the EPM experience. However, the increase of pro-TRH mRNA levels and decrease in TRH content (suggesting increased release, Figure 2C) support activation of hypothalamic neurons of W rats exposed to the DBT, despite the increased corticosterone secretion *in vitro*, impedes the stimulatory effects of CREB activation (Pérez-Martínez et al., 1998; Cote-Vélez et al., 2005). As the times assayed were adequate to detect TSH release (Aguilar-Valles et al., 2007; Sánchez et al., 2007), other factors such as an increased release of corticosterone (Wilber and Utiger, 1969) or hypothalamic somatostatin (Arancibia et al., 2000) could dissociate this process at the pituitary level by inhibiting TRH-induced TSH release. Basal levels of TRH mRNA did not differ between W or WKY strains, as previously reported (Suzuki et al., 2001). Although TRH expression was also increased in the dorsal hypothalamus of WKY rats exposed to the DBT, TRH release seemed inhibited, coincident with the reduced secretion of ppTRH 176–199 (Suzuki et al., 2001) and their paradoxical HPT response (Redei et al., 2001). *In situ* hybridization studies are required to distinguish whether TRH expression is preferentially induced in non-hypophysiotropic neurons involved in autonomic regulation (Markakis and Swanson, 1997; Sánchez et al., 2001). Activation of TRH neurons could thus relate to the metabolic demands imposed by paradigms that involve increased activity, as previously observed in the Morris water maze (Aguilar-Valles et al., 2007), and supported by the association of TRH mRNA levels and general activity in the EPM (Figure 6D and E). A general effect of stress inhibition of the HPT axis is unlikely since models of psychological stress such as 2 h immobilization, or 30 min of restraint decrease TRH mRNA levels in the PVN, TSH and T4 serum concentrations (Pacák and Palkovits, 2001; García-Vázquez et al., 2006) which did not occur in these studies.

4.3. Response of the amygdala

Although most types of stress, physical or psychological, activate CRH neurons in the PVN, only those with emotional content activate CRH neurons of the amygdala (Bakshi and Kalin, 2000; Makino et al., 2002; Schulkin et al., 2005). CRH mRNA levels increased in the amygdala of Wistar rats but not in WKY exposed to DBT, in contrast to the PVN, where levels augmented only in WKY. GR mRNA levels showed a tendency to increase in Wistar rats after DBT exposure (Figure 3A and B). Little is known regarding modulation of GR mRNA levels in amygdala, which is expressed in both central and medial amygdaloid nuclei (de Kloet et al., 2005; Herman et al., 2005). Nevertheless, the involvement of amygdalar GR in modulating glucocorticoid effects has been shown in memory processes (Donley et al., 2005; Maroun and Akirav, 2007). The differential response in CRH and GR expression between the PVN and amygdala of both strains most likely reflected their disparity in coping with stress (Paré, 1992; Pardon et al., 2002). WKY rats display higher immobility and learned helplessness in behavioural tests and are proposed as good models of depression (Rittenhouse et al., 2002).

The refractory response of the amygdala indicates the insensitivity of this strain to changes in glucocorticoid status.

The lack of increase in CRH mRNA levels of the amygdala suggests that the EPM test did not produce psychological stress. As animals were tested during the early hours of the dark phase, when corticosterone levels are at their peak (Kwak et al., 1992) and the animal is awake and active, exploring the maze might not be as threatening. The association between CRH and CRH-R1 mRNA levels with activity (positive and negative, respectively), together with the U-shaped relationship with anxiety scores suggest a defined threshold between arousal and anxiety for the activity of CRHergic neurons. This is supported by the effects of ICV CRH on increased arousal and attention but which in excess, induces anxiety and fear behaviours (Heinrichs and Koob, 2004; Schulkin et al., 2005).

As mentioned, ICV administration of TRH reduced burying time in the DBT. The endogenous activity of the amygdalar TRHergic pathway seemed inhibited in Wistar rats exposed to the DBT, inferred by the increase in TRH content and decrease in pro-TRH mRNA levels. In contrast, in the WKY rats where no display of defensive conduct is observed, CRH mRNA levels did not change, those of TRH increased but TRH release, decreased. Whether this different response represents a compensatory mechanism in the WKY strain to an acute anxiogenic stimulus remains to be tested. However, these results support that the activity of these peptidergic neurons in the amygdala are important for understanding the behavioural differences among these strains.

The activation of amygdala TRH-circuitry, in the EPM task, is supported by the correlation between behavioural parameters of decreased anxiety and increased release of TRH or its mRNA levels (being higher in those animals that spent more time in the OA). This correlation was observed also in animals tested during the light phase of the cycle (Gutiérrez-Mariscal and Joseph-Bravo, 2008). Since no correlation was observed with the total number of entries into the CA, which represents total activity (Rodgers and Dalvi, 1997), the results support the involvement of TRH neurons from the amygdala in modulating anxiety behaviour.

TRH is expressed in the basolateral, in contrast to CRH, which is expressed in the central nucleus of the amygdala. All elements involved in TRH transmission are present: immunoreactive neurons and terminals are detected in the central and medial nuclei (Lechan et al., 1987), as well as TRH binding, with the highest labelling observed in the lateral nucleus (Pazos et al., 1985). Both types of TRH receptors are expressed, but the concentration of TRH-R1 mRNA is higher than that of TRH-R2, particularly in the medial amygdaloid nucleus. Only TRH-R1 is found in the lateral amygdala and the basomedial nucleus, while TRH R2 expression is higher than TRH-R1 in the central nucleus (Heuer et al., 2000). Given this distribution it is highly possible that TRH neurons of the amygdala have local projections within this structure, but they could also project to other areas. Based on the CNS distribution of the two receptors they are proposed to fulfil different functions: TRH-R1 mainly transducing neuroendocrine signals while TRH-R2 mediating cognitive and higher CNS-activities (Sun et al., 2003). The expression of TRH-R1 but not TRH-R2 mRNA levels were modulated in the amygdala after the EPM

experience of animals tested during the dark phase (these results) or the light (Gutiérrez-Mariscal and Joseph-Bravo, 2008). These data, and the increased expression of TRH-R1 in hippocampus of spatial trained rats in the MWM, support a role of this receptor not confined to metabolic activities recently confirmed with the TRH-R1 KO mice that display increased anxiety-like behaviour (Zeng et al., 2007).

Situations of chronic stress such as 14 days of restraint (García-Vázquez et al., 2006) or 48 h of fasting (de Gortari et al., 2000b) also diminish TRH mRNA levels and increase TRH content. We propose that the inhibition of TRH signalling within the amygdala, might contribute to the establishment and manifestation of anxiety-like responses. The regulation of elements of the TRHergic transmission have important implications for the role of this peptide during anxiety-like situations and supports the growing notion that neuropeptides in general (Holmes et al., 2003) and TRH in particular (Gary et al., 2003), have neuromodulatory functions that are independent of its neuroendocrine roles.

4.4. TRH in limbic areas

Screening variations in TRH content of limbic regions, where TRH terminals are found, allows recognition of the specificity of effects. As mentioned, amygdala was the only region that showed task-related changes in TRH content in both strains. However, at this moment it is difficult to explain why TRH content in most limbic areas of the WKY strain was higher than in Wistar rats, except for septum. The only report in this regard is that of Suzuki et al. (2001) who found no differences in the levels of the cryptic peptide PPTRH 178–199 in the lateral septum. We did not detect variations in TRH septal content after the DBT (these results) or, after 30 min of restraint (García-Vázquez et al., 2006) in contrast to the increased release reported after the stress induced by 30 min immobilization (Takayama et al., 1986) or in animals submitted to the EPM during the light cycle (Gutiérrez-Mariscal and Joseph-Bravo, 2008). As the experiments reported here were performed during the active dark cycle, these differences could relate to the arousal properties of TRH in this region and differences in coping with different kinds of stress during the light phase.

In hippocampus, TRH content and mRNA levels were increased in Wistar Y rats, compared to Hab C, which could relate to the context-, time- or spatial-learning process of animals exploring the cage for the 4th day (Aguilar-Valles et al., 2007); the values of DBT+, equal or lower to Hab C (TRH mRNA or pg levels, respectively), suggest that the stressful event of probe stimulation caused inhibition of this response. This was not observed in the WKY who instead, showed a tendency to increase TRH levels in frontal cortex after DBT exposure.

Increased TRH levels in frontal cortex occurs in animals submitted to 30 min restraint (García-Vázquez et al., 2006) and (although the high variability impedes statistical significance) in animals submitted to the EPM during light or dark phases (Gutiérrez-Mariscal and Joseph-Bravo, 2008). If the hypothesis put forward (that increased TRH levels at 30 min represent decreased release) is valid, TRHergic neurons in frontal cortex were inhibited. Whether these

changes relate to the stimulatory effect of TRH on noradrenaline or Acetylcholine release in frontal cortex (Prokai, 2002) and the role of this structure in codifying stress circuits (Herman et al., 2005) await resolution. Inhibition of TRH neurons in this region is also observed after acute ethanol exposure where activation is observed in *n. accumbens* or hippocampus (de Gortari et al., 2000a, 2005). The differential responses support region- and condition-specific effects. Due to the apparent contradictory responses of TRH the proposal that this neuropeptide serves as an homeostatic regulator of brain function has been proposed (Gary et al., 2003).

In summary, these results support the participation of amygdalar TRH in the signalling cascade induced during anxiety-like situations. The role of neuropeptide regulation of complex behaviours has given rise to new strategies for the treatment of depression and anxiety. Receptor antagonists for anxiogenic peptides (CRH, substance P and neurokinins, MCH, galanin, CCK) or agonists for those showing anxiolytic effects (NPY through Y1 or Y5 receptors, opioid peptides) provide promising results in the treatment of depression and anxiety disorders (Holmes et al., 2003; Gerald et al., 2006). Unfortunately, the use of some agonists or antagonists for neuropeptide receptors induce undesired side-effects, given their diverse roles dependent on the neural or endocrine circuitry involved, thus limiting their clinical efficacy. Inhibitors of the ectoenzymes involved in neuropeptide degradation have also been considered for diverse pathologies (Roques, 2000; Turner, 2003). However, most neuropeptides are inactivated by more than one ectopeptidase, and each enzyme can recognize several substrates (Konkoy and Davis, 1996). TRH has the particular advantage of being inactivated by a very specific ectopeptidase (PP2) that does not recognize other known endogenous neuropeptides (Kelly et al., 2000). A specific inhibitor of PP2, without effect on TRH-receptors, could enhance the levels of TRH following release in stimulated pathways allowing a more specific effect, analogous to neurotransmitter reuptake inhibitors as fluoxetine. Further characterization of the involvement of TRH neurons in the limbic system and stress-induced pathologies is therefore promising.

In conclusion, we presented evidence supporting an anxiolytic role of centrally administered TRH and the involvement of limbic TRHergic neurons in the responses elicited by anxiety paradigms; in particular, we demonstrated that the activation of TRHergic pathways in the amygdala is inversely proportional to anxiety.

Role of the funding source

Funding for this study was provided by CONACYT 43503Q and DGAPA-UNAM IN215507. Neither of them had any further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report or in the decision to submit the paper for publication.

Conflict of interest

All authors declare there is no actual or potential interest with other people or organizations within the 3 years of beginning this work.

Acknowledgements

The authors thank the helpful comments of Drs. Jean-Louis Charli and Gina Quirate during the development of this work and, together with Dr. V. Walbot, for reviewing the manuscript. The aid of Dr. Rosa Ma. Uribe in the EPM procedure, as well as the technical support of QFB Miguel Cisneros, Q. Fidelia Romero, Sergio González, and Ms. Isabel Beltrán is gratefully acknowledged.

References

- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., Balderas, I., Ramirez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2005. Analysis of the stress response in rats trained in the water-maze: differential expression of corticotropin-releasing hormone, CRH-R1, glucocorticoid receptors and brain-derived neurotrophic factor in limbic regions. *Neuroendocrinology* 82, 306–319.
- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., García-Vázquez, A.I., Ramirez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2007. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem. Int.* 50, 404–417.
- Arancibia, S., Tapia-Arancibia, L., Assenmacher, I., Astier, H., 1983. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 37, 225–228.
- Arancibia, S., Estupina, C., Tapia-Arancibia, L., 2000. Rapid reduction in somatostatin mRNA expression by hypothalamic neurons induced by dexamethasone. *NeuroReport* 11, 3163–3167.
- Bakshi, V.P., Kalin, N.H., 2000. Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene–environment interactions. *Biol. Psychiatry* 48, 1175–1198.
- Baum, A.E., Solberg, L.C., Churchill, G.A., Ahmadiyeh, N., Takahashi, J.S., Redei, E.E., 2006. Test- and behavior-specific genetic factors affect WKY hypoactivity in tests of emotionality. *Behav. Brain Res.* 169, 220–230.
- Blackmore, C.G., Varro, A., Dimaline, R., Bishop, L., Gallacher, D.V., Dockray, G.J., 2001. Measurement of secretory vesicle pH reveals intravesicular alkalization by vesicular monoamine transporter type 2 resulting in inhibition of prohormone cleavage. *J. Physiol.* 531, 605–617.
- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y., Schally, A.V., 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl–histidyl–proline amide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 37, 5–10.
- Carobrez, A.P., Bertoglio, L.J., 2005. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29, 1193–1205.
- Charli, J.L., Méndez, M., Joseph-Bravo, P., Wilk, S., 1987. Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9, 373–378.
- Cheong, K.H., Lee, M.A., Han, S.Y., Shields, D., Park, S.D., Hong, S.H., 2002. Evidence of a novel dipeptidyl aminopeptidase in mammalian GH(3) cells: new insights into the processing of peptide hormone precursors. *Cell Struct. Funct.* 27, 145–155.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Cote-Vélez, A., Pérez-Martínez, L., Diaz-Gallardo, M.Y., Pérez-Monter, C., Carreon-Rodríguez, A., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2005. Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 177–197.
- De Boer, S.F., Koolhaas, J.M., 2003. Defensive burying in rodents: ethology, neurobiology and psychopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.* 463, 145–161.
- de Gortari, P., Fernandez-Guardiola, A., Martínez, 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., Méndez, M., Rodríguez-Keller, I., Pérez-Martínez, L., Joseph-Bravo, P., 2000a. Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem. Int.* 37, 483–496.
- de Gortari, P., González Alzati, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., 2000b. Effects of fasting on the content of TRH and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nutr. 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, R.M., García-Vázquez, A., Aguilar-Valles, A., Martínez, A., Valdes, A., Charli, J.L., 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, E.R., Joels, M., Holsboer, F., 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 463–475.
- Donley, M.P., Schulkin, J., Rosen, J.B., 2005. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. *Behav. Brain Res.* 164, 197–205.
- El Meskini, R., Culotta, V.C., Mains, R.E., Eipper, B.A., 2003. Supplying copper to the cuproenzyme peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase. *J. Biol. Chem.* 278, 12278–12284.
- Fekete, C., Mihaly, E., Luo, L.G., Kelly, J., Clausen, J.T., Mao, Q., Rand, W.M., Moss, L.G., Kuhar, M., Emerson, C.H., Jackson, I.M., Lechan, R.M., 2000. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript—immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic–pituitary–thyroid axis during fasting. *J. Neurosci.* 20, 9224–9234.
- Flier, J.S., Harris, M., Hollenberg, A.N., 2000. Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J. Clin. Invest.* 105, 859–861.
- Gainer, H., Chin, H., 1998. Molecular diversity in neurosecretion: reflections on the hypothalamo-neurohypophysial system. *Cell Mol. Neurobiol.* 18, 211–230.
- García-Vázquez, A., Rebolledo-Solleiro, D., Joseph-Bravo, P., 2006. Restraint stress modifies the activity of TRHergic neurons in amygdala and hypothalamus. In: Sixth International Congress of Neuroendocrinology. Pittsburgh, Pennsylvania, USA, p328.
- Gary, K.A., Sevarino, K.A., Yarbrough, G.G., Prange, A.J., Winokur, A., 2003. The thyrotropin-releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: Implications for TRH-based therapeutics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 410–416.
- Gerald, C., Antonijevic, I., Branchek, T., 2006. Novel mechanisms to treat depression and anxiety: will neuropeptide antagonists succeed. *Drug Discov. Today: Therap. Strat.* 3, 467–473.
- Gutiérrez-Mariscal, M., Joseph-Bravo, P., 2008. The response of limbic TRH neurons in the Elevated plus maze depends on

- circadian conditions. In: Kvetnansky, K., Pacak, K. (Eds.), *Catecholamines and Other Neurotransmitters in Stress*. Ann. N.Y. Acad. Sci., in press.
- Han, F., Ozawa, H., Matsuda, K.I., Lu, H., de Kloet, E.R., Kawata, M., 2007. Changes in the expression of corticotrophin-releasing hormone, mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus induced by fornix transection and adrenalectomy. *J. Neuroendocrinol.* 19, 229–238.
- Han, W., Li, D., Stout, A.K., Takimoto, K., Levitan, E.S., 1999. Ca²⁺-Induced deprotonation of peptide hormones inside secretory vesicles in preparation for release. *J. Neurosci.* 19, 900–905.
- Harthoorn, L.F., Oudejans, R.C., Diederer, J.H., Van der Horst, D.J., 2002. Coherence between biosynthesis and secretion of insect adipokinetic hormones. *Peptides* 23, 629–634.
- Hauger, R.L., Shelat, S.G., Redei, E.E., 2002. Decreased corticotropin-releasing factor receptor expression and adrenocorticotrophic hormone responsiveness in anterior pituitary cells of Wistar-Kyoto rats. *J. Neuroendocrinol.* 14, 126–134.
- Heinrichs, S.C., Koob, G.F., 2004. Corticotropin-releasing factor in brain: A role in activation, arousal, and affect regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311, 427–440.
- Herman, J.P., Ostrander, M.M., Mueller, N.K., Figueiredo, H., 2005. Limbic system mechanisms of stress regulation: Hypothalamo-pituitary–adrenocortical axis. *Progr. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 29, 1201–1213.
- Heuer, H., Schafer, M.K.H., 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.
- Hokfelt, T., Tsuru, Y., Ulfhake, B., Cullheim, S., Arvidsson, U., Foster, G.A., Schultzberg, M., Schalling, M., Arborelius, L., Freedman, J., Post, C., Visser, T., 1989. Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 553, 76–105.
- Holmes, A., Heilig, M., Rupniak, N.M., Steckler, T., Griebel, G., 2003. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 580–588.
- Horita, A., 1998. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci.* 62, 1443–1448.
- Jaworska-Feil, L., Budziszewska, B., Lason, W., 1997. Effects of repeated cocaine administration on the thyrotropin-releasing hormone level and receptors in the rat brain. *Neuropeptides* 31, 253–258.
- Joseph-Bravo, P., 2004. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone neurons as transducers of energy homeostasis. *Endocrinology* 145, 4813–4815.
- Joseph-Bravo, P., Uribe, R.M., Vargas, M.A., Pérez-Martínez, L., Zoeller, T., Charli, J.L., 1998. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol. Neurobiol.* 18, 231–247.
- Karandrea, D., Kittas, C., Kitraki, E., 2000. Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress. *Neuroendocrinology* 71, 343–353.
- Kelly, J.A., Slator, G.R., Tipton, K.F., Williams, C.H., Bauer, K., 2000. Kinetic investigation of the specificity of porcine brain thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme for thyrotropin-releasing hormone-like peptides. *J. Biol. Chem.* 275, 16746–16751.
- Knoblach, S.M., Kubek, M.J., 1997. Increases in thyrotropin-releasing hormone messenger RNA expression induced by a model of human temporal lobe epilepsy: effect of partial and complete kindling. *Neuroscience* 76, 85–95.
- Konkoy, C.S., Davis, T.P., 1996. Ectoenzymes as sites of peptide regulation. *Trends Pharmacol. Sci.* 17, 288–294.
- Koponen, E., Voikar, V., Riekkilä, R., Saarelainen, T., Rauramaa, T., Rauvala, H., Taira, T., Castren, E., 2004. Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCγ pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol. Cell. Neurosci.* 26, 166–181.
- Kovács, K.J., Sawchenko, P.E., 1996. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J. Neurosci.* 16, 262–273.
- Kubek, M.J., Knoblach, S.M., Sharif, N.A., Burt, D.R., Buterbaugh, G.G., Fuson, K.S., 1993. Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann. Neurol.* 33, 70–76.
- Kwak, S.P., Young, E.A., Morano, I., Watson, S.J., Akil, H., 1992. Diurnal corticotropin-releasing hormone mRNA variation in the hypothalamus exhibits a rhythm distinct from that of plasma corticosterone. *Neuroendocrinology* 55, 74–83.
- Lechan, R.M., Wu, P., Jackson, I.M., 1987. Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology* 121, 1879–1891.
- Lifschytz, T., Segman, R., Shalom, G., Lerer, B., Gur, E., Golzer, T., Newman, M.E., 2006. Basic mechanisms of augmentation of antidepressant effects with thyroid hormone. *Curr. Drug Targets* 7, 203–210.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Makino, S., Hashimoto, K., Gold, P.W., 2002. Multiple feedback mechanisms activating corticotropin-releasing hormone system in the brain during stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 73, 147–158.
- Markakis, E.A., Swanson, L.W., 1997. Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvocellular neuroendocrine system. *Brain Res. Rev.* 24, 255–291.
- Maroun, M., Akirav, I., 2007. Arousal and stress effects on consolidation and reconsolidation of recognition memory. *Neuropsychopharmacology* doi:10.1038/sj.npp.1301401, 1–12.
- Mayr, B., Montminy, M., 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 599–609.
- McGivern, R.F., Rittenhouse, P., Aird, F., Van de Kar, L.D., Redei, E., 1997. Inhibition of stress-induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat by prepro-thyrotropin-releasing hormone 178–199. *J. Neurosci.* 17, 4886–4894.
- Menard, J., Treit, D., 1999. Effects of centrally administered anxiolytic compounds in animal models of anxiety. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 591–613.
- Nillni, E.A., Sevarino, K.A., 1999. The biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocr. Rev.* 20, 599–648.
- Pacák, K., Palkovits, M., 2001. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502–548.
- Palkovits, M., Brownstein, M.J., 1988. *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*. Elsevier, New York.
- Pardon, M.C., Gould, G.G., García, A., Phillips, L., Cook, M.C., Miller, S.A., Mason, P.A., Morilak, D.A., 2002. Stress reactivity of the brain noradrenergic system in three rat strains differing in their neuroendocrine and behavioral responses to stress: implications for susceptibility to stress-related neuropsychiatric disorders. *Neuroscience* 115, 229–242.
- Paré, W.P., 1992. The performance of WKY rats on three tests of emotional behavior. *Physiol. Behav.* 51, 1051–1056.
- Pazos, A., Cortes, R., Palacios, J.M., 1985. Thyrotropin-releasing hormone receptor binding sites: autoradiographic distribution in the rat and guinea pig brain. *J. Neurochem.* 45, 1448–1463.
- Pekary, A.E., Sattin, A., Meyerhoff, J.L., Chilingar, M., 2004. Valproate modulates TRH receptor, TRH and TRH-like peptide levels in rat brain. *Peptides* 25, 647–658.

- Pekary, A.E., Stevens, S.A., Sattin, A., 2006. Rapid modulation of TRH and TRH-like peptide levels in rat brain and peripheral tissues by corticosterone. *Neurochem. Int.* 48, 208–217.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S.E., Briley, M., 1985. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167.
- Perelló, M., Nillni, E.A., 2007. The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front. Biosci.* 12, 3554–3565.
- Perelló, M., Stuart, R.C., Varslet, C.A., Nillni, E.A., 2007. Cold exposure increases the biosynthesis and proteolytic processing of prothyrotropin releasing hormone in the hypothalamic paraventricular nucleus via beta-adrenoreceptors. *Endocrinology* DOI 10.1210/en.2007-0522.
- Pérez-Martínez, L., Carreon-Rodríguez, A., González-Alzati, M.E., Morales, C., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68, 345–354.
- Phelps, E.A., LeDoux, J.E., 2005. Contributions of the amygdala to emotion processing: from animal models to human behavior. *Neuron* 48, 175–187.
- Poldrack, R.A., Packard, M.G., 2003. Competition among multiple memory systems: converging evidence from animal and human brain studies. *Neuropsychologia* 41, 245–251.
- Prokai, L., 2002. Central nervous system effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogues. *Progr. Drug Res.* 59, 133–169.
- Redei, E.E., Solberg, L.C., Kluczynski, J.M., Pare, W.P., 2001. Paradoxical hormonal and behavioral responses to hypothyroid and hyperthyroid states in the Wistar-Kyoto rat. *Neuropsychopharmacology* 24, 632–639.
- Rittenhouse, P.A., Lopez-Rubalcava, C., Stanwood, G.D., Lucki, I., 2002. Amplified behavioral and endocrine responses to forced swim stress in the Wistar-Kyoto rat. *Psychoneuroendocrinology* 27, 303–318.
- Rodgers, R.J., Dalvi, A., 1997. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 21, 801–810.
- Rodgers, R.J., Cao, B.J., Dalvi, A., Holmes, A., 1997. Animal models of anxiety: an ethological perspective. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30, 289–304.
- Rodríguez-Manzo, G., Lopez-Rubalcava, C., Fernandez-Guasti, A., 1999. Anxiolytic-like effect of ejaculation under various sexual behavior conditions in the male rat. *Physiol. Behav.* 67, 651–657.
- Rondeel, J.M., de Greef, W.J., van der Vaart, P.D., van der, S.P., Visser, T.J., 1989. In vivo hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone after electrical stimulation of the paraventricular area: comparison between push-pull perfusion technique and collection of hypophysial portal blood. *Endocrinology* 125, 971–975.
- Roques, B.P., 2000. Novel approaches to targeting neuropeptide systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 21, 475–483.
- Rosen, J.B., Cain, C.J., Weiss, S.R., Post, R.M., 1992. Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 15, 247–255.
- Sánchez, E., Uribe, R.M., Corkidi, G., Zoeller, R.T., Cisneros, M., Zacarias, M., Morales-Chapa, C., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2001. Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 74, 407–422.
- Sánchez, E., Fekete, C., Lechan, R.M., Joseph-Bravo, P., 2007. Cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) expression is differentially regulated in the hypothalamic paraventricular nucleus of lactating rats exposed to suckling or cold stimulation. *Brain Res.* 1132, 120–128.
- Scheen, A.J., Buxton, O.M., Jison, M., Van Reeth, O., Leproult, R., L'Hermite-Baleriaux, M., Van Cauter, E., 1998. Effects of exercise on neuroendocrine secretions and glucose regulation at different times of day. *Am. J. Physiol.* 274, E1040–E1049.
- Schulkin, J., Morgan, M.A., Rosen, J.B., 2005. A neuroendocrine mechanism for sustaining fear. *Trends Neurosci.* 28, 629–634.
- Sharif, N.A., 1989. Quantitative autoradiography of TRH receptors in discrete brain regions of different mammalian species. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 553, 147–175.
- Spijker, S., Sharp-Baker, H.E., Geraerts, W.P.M., Van Minnen, J., Smit, A.B., 2004. Stimulus-dependent regulation and cellular expression of genes encoding neuropeptides, prohormone convertases, alpha-amidating enzyme and 7B2 in identified Lymnaea neurons. *J. Neurochem.* 90, 287–296.
- Stocca, G., Nistri, A., 1995. Enhancement of Nmda receptor-mediated synaptic potentials of rat hippocampal-neurons in-vitro by thyrotropin-releasing-hormone. *Neurosci. Lett.* 184, 9–12.
- Stocca, G., Nistri, A., 1996. The neuropeptide thyrotropin-releasing hormone modulates GABAergic synaptic transmission on pyramidal neurons of the rat hippocampal slice. *Peptides* 17, 1197–1202.
- Sun, Y., Lu, X., Gershengorn, M.C., 2003. Thyrotropin-releasing hormone receptors-similarities and differences. *J. Mol. Endocrinol.* 30, 87–97.
- Suzuki, S., Solberg, L.C., Redei, E.E., Handa, R.J., 2001. Preprothyrotropin releasing hormone 178–199 immunoreactivity is altered in the hypothalamus of the Wistar-Kyoto strain of rat. *Brain Res.* 913, 224–233.
- Takayama, H., Ota, Z., Ogawa, N., 1986. Effect of immobilization stress on neuropeptides and their receptors in rat central nervous system. *Regul. Peptides* 15, 239–248.
- Thompson, B.L., Rosen, J.B., 2000. Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides* 34, 38–44.
- Treit, D., Pinel, J.P., Fibiger, H.C., 1981. Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15, 619–626.
- Turner, A.J., 2003. Exploring the structure and function of zinc metallopeptidases: old enzymes and new discoveries. *Biochem. Soc. Trans.* 31, 723–727.
- Uribe, R.M., Redondo, J.L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58, 140–145.
- Uribe, R.M., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., 1995. Pups removal enhances thyrotropin-releasing hormone mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Eur. J. Endocrinol.* 133, 354–360.
- van Haasteren, G.A., van Toor, H., Klootwijk, W., Handler, B., Linkels, E., van der, S.P., van Ophemert, J., de Jong, F.H., Visser, T.J., de Greef, W.J., 1996. Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotrophin secretion during lactation. *J. Endocrinol.* 148, 325–336.
- Vargas, M.A., Méndez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., 1987. Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate amino peptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79, 311–314.
- Vargas, M.A., Uribe, R.M., Cisneros, M., Romero, F., González, S., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., 2002. Thyrotropin-releasing hormone regulates the diurnal variation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity in the male rat adenohypophysis. *Eur. J. Endocrinol.* 147, 363–369.
- Vogel, R.A., Frye, G.D., Wilson, J.H., Kuhn, C.M., Mailman, R.B., Mueller, R.A., Breese, G.R., 1980. Attenuation of the effect of punishment by thyrotropin-releasing hormone: comparisons with chlordiazepoxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212, 153–161.

- Watts, A.G., 2005. Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front. Neuroendocrinol.* 26, 109–130.
- Wilber, J.F., Utiger, R.D., 1969. The effect of glucocorticoids on thyrotropin secretion. *J. Clin. Invest.* 48, 2096–2103.
- Yu, R., Hinkle, P.M., 1998. Signal transduction, desensitization, and recovery of responses to thyrotropin-releasing hormone after inhibition of receptor internalization. *Mol. Endocrinol.* 12, 737–749.
- Zeng, H., Schimpf, B.A., Rohde, A.D., Pavlova, M.N., Gragerov, A., Bergmann, J.E., 2007. Thyrotropin-releasing hormone receptor 1 deficient mice display increased depression and anxiety like behavior. *Mol. Endocrinol.* 12, 12 [Epub ahead of print].

XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., Balderas, I., Ramírez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2005. Analysis of the Stress Response in Rats Trained in the Water-Maze: Differential Expression of Corticotropin-Releasing Hormone, CRH-R1, Glucocorticoid Receptors and Brain-Derived Neurotrophic Factor in Limbic Regions. *Neuroendocrinology*. 82(5-6), 306-319.
- Aguilar-Valles, A., Sánchez, E., de Gortari, P., García-Vázquez, A.I., Ramírez-Amaya, V., Bermúdez-Rattoni, F., Joseph-Bravo, P., 2007. The expression of TRH, its receptors and degrading enzyme is differentially modulated in the rat limbic system during training in the Morris water maze. *Neurochem. Int.* 50(2), 404-417.
- Aguilera, G., Kiss, A., Liu, Y., Kamitakahara, A. (2007). Negative regulation of corticotropin releasing factor expression and limitation of stress response. *Stress*. 10(2), 153-161.
- Arnold R, Klingberg F y Schaker W. (1991) Systemically applied thyrotropin-releasing hormone (TRH) modifies spontaneous behaviour of rats. . *Biomed Biochim Acta* 50:1217-1224.
- Bakshi VP y Kalin NH (2000) Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene–environment interactions. . *Biol. Psychiatry* 48:1175–1198.
- Bhargava HN y Matwyshyn GA (1980) Influence of thyrotropin releasing hormone and histidyl-proline diketopiperazine on spontaneous locomotor activity and analgesia induced by [Delta]9-tetrahydrocannabinol in the mouse. *European Journal of Pharmacology* 68(2):147-154.
- Blanchard R, McKittrick C, y Blanchard D (2001) Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiology y Behavior* 73(3):261-271.
- Boler J, Enzmann F, Folkers K, Bowers CY, y A.V. S (1969) The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide. . *Biochem Biophys Res Commun.* 377:5-10.
- Breese DR, Cott JM, Cooper BR, Prange AJ, y Lipton MA (1974) Antagonism of ethanol narcosis by thyrotropin-releasing-hormone. *Life Sciences* 14:1053-1063.
- Burgus R, Dunn TF, Desiderio D, y Guillemin R (1969) Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the [PCA-His-Pro-NH₂ sequence]. . *C R Acad Sci Hebd Sciences Acad Sci D.* 269:1870-1873.
- Carobrez AP y Bertoglio LJ (2005) Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. *Neurosci. Biobehav. Rev* 29:1193–1205.
- Chang F-C y Opp MR (2001) Corticotropin-releasing hormone (CRH) as a regulator of waking. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews* 25(5):445-453.
- Charli J, et al. (1998) TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology (Bp)* 6(1):45-57.
- Charli JL, Pascual I, Cruz R, y Vargas M (2006.) Post- secretory inactivation of peptides in the hypothalamic-adenohypophyseal axis. Focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin releasing hormone inactivating ectoenzyme *Molecular Endocrinology* . Ed. P. Joseph (Research Singpost, India):39-64.

- Cheong KH, et al. (2002) Evidence of a novel dipeptidyl aminopeptidase in mammalian GH(3) cells: new insights into the processing of peptide hormone precursors. *Cell Struct. Funct.* 27:145–155.
- Choleris ET, Kavaliers M, y Prato FS (2001) A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews* 25(3):235-260.
- Cizza G BL, 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(6):440-448.
- Clement Y., Chapouthier, G., 1998. Biological Bases of Anxiety. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 22, 623-633.
- Conrad C, Lupien S y McEwen B (1999) Support for a bimodal role for type II adrenal steroid receptors in spatial memory. *Neurobiol Learn Mem* 72:39–46.
- Covarrubias L, et al. (1994) In vitro TRH release from hypothalamus slices varies during the diurnal cycle. . *Neurochem Res* 19(7):845-850
- Covarrubias L, Uribe RM, Mendez M, Charli JL, y Joseph-Bravo P (1988) Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochem Biophys Res Commun* 151(1):615-622
- Croiset G, Nijssen MJMA, y Kamphuis PJGH (2000) Role of corticotropin-releasing factor, vasopressin and the autonomic nervous system in learning and memory. *European Journal of Pharmacology* 405(1-3):225-234.
- D'Agostino JB, Vaeth GF, y Henning SJ (1982) Diurnal rhythm of total and free concentrations of serum corticosterone in the rat. *Acta Endocrinologica.* 100:85-90.
- Dallman MF (2003) Stress by any other name ...? *Hormones and Behavior* 43(1):18-20.
- Davis M, Walker DL, Miles L, y Grillon C (2009) Phasic vs Sustained Fear in Rats and Humans: Role of the Extended Amygdala in Fear vs Anxiety. *Neuropsychopharmacology* 35(1):105-135.
- Day TA (2005) Defining stress as a prelude to mapping its neurocircuitry: No help from allostasis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 29(8):1195-1200.
- de Gortari P, Fernández-Guardiola A, Martínez A, Cisneros M y Joseph-Bravo P (1995) Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II, during the development of amygdaloid kindling. *Brain Research* 679(1):144-150.
- de Gortari P, Fernandez-Guardiola, A., Martínez, A., Cisnoeros, M., Joseph-Bravo, P. (2000) Effects of fasting on the content of TRH or its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nutr. Neurosci.* 3.
- de Gortari P, Romero F, Cisneros M, y Joseph-Bravo P (2005) Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl amino peptidase II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochemistry International* 46(4):347-356.

- de Gortari P, et al. (2006) Amygdala kindling differentially regulates the expression of the elements involved in TRH transmission. *Neurochemistry International* 48(1):31-42.
- de Kloet ER, Joëls M, y Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews in Neuroscience* 6:463-475.
- De Léan A, Feland L, Drouing J, Kelly PA, y Labrie F (1976,) Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. . *Endocrinology* 100:1496-1504.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, y Tasker JG (2003) Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *Journal of Neuroscience* 23: 4850–4857.
- Di S, Malcher-Lopes R, Marcheselli VL, Bazan NG, y Tasker JG (2005.) Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology* 146:4292–4301.
- Eilam D (2003) Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behavioural Brain Research* 142(1-2):53-62.
- Fink G, Koch Y, y Ben-Aroya N (1993) TRH in hypophysial portal blood: Characteristics of release and relationship to thyrotropin and prolactin secretion. . *Thyrotropin-Releasing Hormone.* , eds Griffiths E.C. y Bennett G.W. (Raven press New York), pp 127-144.
- Fleming AA y Todd AJ (1994) Thyrotropin-releasing hormone- and GABA-like immunoreactivity coexist in neurons in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Brain Research* 638(1-2):347-351.
- Flier JS, Harris M, y Hollenberg AN (2000) Leptin, nutrition, and the thyroid: the why, the wherefore, and the wiring. *J. Clin. Invest.* 105:859–861.
- French TA, Masserano JM, y Weiner N (1993) Influence of thyrotropin-releasing-hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 17:99-106.
- Gallagher JP, Orozco-Cabal LF, Liu J, y Shinnick-Gallagher P (2008) Synaptic physiology of central CRH system. *European Journal of Pharmacology* 583(2-3):215-225.
- García-Vázquez AI (2006) El estrés psicológico modula la actividad de las neuronas TRHérgicas del sistema límbico. Tesis Maestría en Ciencias, Posgrado en Bioquímica. Instituto de Biotecnología, Asesora: Dra. Patricia Joseph Bravo. UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Gary KA, Sevarino KA, Yarbrough GG, Prange AJ, Jr., y Winokur A (2003) The Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Hypothesis of Homeostatic Regulation: Implications for TRH-Based Therapeutics. *J Pharmacol Exp Ther* 305(2):410-416.
- Giovannini MG, Casamenti F, Nistri A, Paoli F, y Pepeu G (1991) Effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on acetylcholine release from different brain areas investigated by microdialysis. . *British Journal of Pharmacology.* 102:363-368.
- Glue P, Bailey J, Wilson S, Hudson A, y Nutt DJ (1992) Thyrotropin-releasing hormone selectively reverses clorazepam-induced sedation but not flowing of saccadic eye movements. *Life Sciences* 50:PL25-PL30.

- Goldstein DS y Kopin IJ (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10(2):109-120.
- Grad I y Picard D (2007) The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275(1-2):2-12.
- Gross C. y Hen R. 2004. The developmental origins of anxiety. *Nature Reviews Neuroscience*. 5: 545-552.
- Gutiérrez-Mariscal M, de Gortari P, López-Rubalcava C, Martínez A, y Joseph-Bravo P (2008) Analysis of the anxiolytic-like effect of TRH and the response of amygdalar TRHergic neurons in anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 33(2):198-213.
- Hall CS (1936) Emotional behavior in the rat. III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. . *J Comp Psychol* 22:345-352
- Harthoorn LF, Oudejans RC, Diederer JH, y Van der Horst DJ (2002) Coherence between biosynthesis and secretion of insect adipokinetic hormones. . *Peptides* 23:629–634.
- Hartley CA y Phelps EA (2009) Changing Fear: The Neurocircuitry of Emotion Regulation. *Neuropsychopharmacology* 35(1):136-146.
- Hashimoto T, Wada T, Fukuda N, y Nagaoka A (1993) Effect of thyrotropin-releasing hormone on pentobarbitone-induced sleep in rats: continuous treatment with a sustained release injectable formulation. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 45:94-97.
- Heal DJ y Green AR (1979) Administration of thyrotropin releasing hormone (TRH) to rats releases dopamine in n. accumbens but not n. caudatus. *Neuropharmacology* 18(1):23-31.
- Heinrichs SC y Koob GF (2004) Corticotropin-releasing factor in brain: A role in activation, arousal, and affect regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311:427–440.
- Heuer H, Schafer MK-H, O'Donnell D, Walker P, y Bauer K (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *The Journal of Comparative Neurology* 428(2):319-336.
- Hökfelt T, et al. (1989) Distribution of TRH-like Immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. . *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 553: 76–105.
- Horita (1998) An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sciences* 62(17-18):1443-1448.
- Itoh Y, et al. (1994) Effect of NS-3, a thyrotropin-releasing hormone analog, on in vivo acetylcholine released in rat brain: regional differences and its sites of action *J Pharmacol Exp Ther* 271:884-890.
- Itoh Y, et al. (1994) Enhancement of noradrenaline release from rat frontal cortex by thyrotropin releasing hormone and its analog, (3R,6R)-6-methyl-5-oxo-3-thiomorpholinylcarbonyl-L-histidyl-L-prolinami de, as studied by intracerebral microdialysis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 268 (1):255-261.
- Jaferi A y Bhatnagar S (2007) Corticotropin-releasing hormone receptors in the medial prefrontal cortex regulate hypothalamic-pituitary-adrenal activity and anxiety-related behavior regardless of prior stress experience. *Brain Research* 1186:212-223.

- Jasnow AM, et al. (2005) Memory of social defeat is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *Behavioral Neuroscience* 119(4):1125-1130.
- Jaworska-Feil L, Budziszewska B, y Lason W (1997) Effects of repeated cocaine administration on the thyrotropin-releasing hormone level and receptors in the rat brain. *Neuropeptides* 31(3):253-258.
- Joëls M (2006) Corticosteroid effects in the brain: U-shape it *Trends in Pharmacological Sciences* 27(5):244-250
- Joëls M y Baram TZ (2009) The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci* 10(6):459-466.
- Joseph-Bravo P (2004) Hypophysiotropic Thyrotropin-Releasing Hormone Neurons as Transducers of Energy Homeostasis. *Endocrinology* 145(11):4813-4815.
- Joseph-Bravo P, et al. (1998) Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol. Neurobiol.* 18:231–247.
- Joseph-Bravo P, Fresán M, Cisneros M, Vargas M y Charli J (1994) Pyroglutamyl peptidase II activity is not in the processes of bulbospinal TRHergic neurons. *Neuroscience Letters* 178(2):243-246.
- Kalivas P, Stanley D, y Prange A (1987) Interaction between thyrotropin-releasing hormone and the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology* 26: 33-38.
- Kalsbeek A, et al. (2005) Daily Variations in Type II Iodothyronine Deiodinase Activity in the Rat Brain as Controlled by the Biological Clock. *Endocrinology* 146(3):1418-1427.
- Karandrea D, Kittas C, y Kitraki E (2000) Contribution of sex and cellular context in the regulation of brain corticosteroid receptors following restraint stress *Neuroendocrinology* 71:343–353.
- Kasparov S y Chizh B (1992) The NMDA-receptor antagonist dizocilpine (MK-801) suppresses the memory facilitatory action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuropeptides* 23(2):87-92.
- Kelly J, Slator G, Tipton K, Williams C, y Bauer K (2000) Kinetic Investigation of the Specificity of Porcine Brain Thyrotropin-releasing Hormone-degrading Ectoenzyme for Thyrotropin-releasing Hormone-like Peptides *J Biol Chem* 275(22): 16746-16751.
- Kessler R, et al. (2005) Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch Gen Psychiatry* 62:593–602.
- Koponen E, et al. (2004) Transgenic mice overexpressing the full-length neurotrophin receptor trkB exhibit increased activation of the trkB-PLCgamma pathway, reduced anxiety, and facilitated learning. *Mol. Cell. Neurosci.* 26:166–181.
- Kovács KJ (2008) Measurement of Immediate-Early Gene Activation: c-fos and Beyond. *Journal of Neuroendocrinology* 20(6):665-672.
- Kubek MJ, et al. (1993) Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. . *Ann. Neurol.* 33:70–76.
- Kvetnansky R, Sabban EL, y Palkovits M (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev* 89:536-606.

- Liebsch G, et al. (1998) Behavioral, physiological, and neuroendocrine stress responses and differential sensitivity to diazepam in two Wistar rat lines selectively bred for high- and low-anxiety-related behavior. *Neuropsychopharmacology*. 19(5), 381-96. *Neuropsychopharmacology*. 19(5):381-396.
- Lightman SL (2008) The Neuroendocrinology of Stress: A Never Ending Story. *Journal of Neuroendocrinology* 20(6):880-884.
- Lu X, et al. (2002) Diurnal rhythm of agouti-related proteina and its relation to corticosterone and food intake. *Endocrinology* 143 (10):3905-3915
- Makino S, Smith MA, y Gold PW (2002) Regulatory role of glucocorticoids and glucocorticoid receptor mRNA levels on tyrosine hydroxylase gene expression in the locus coeruleus during repeated immobilization stress. *Brain Research* 943(2):216-223.
- McEwen B, S y Stellar E (1993) Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Int Med* 153:2093-2101.
- McGill B, et al. (2006) Enhanced anxiety and stress-induced corticosterone release are associated with increased Crh expression in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48):18267-18272.
- McGivern RF, Rittenhouse P, Aird F, Van de Kar LD, y Redei E (1997) Inhibition of stress-induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat by prepro-thyrotropin-releasing hormone 178–199. *J. Neurosci.* 17:4886–4894.
- Medina Mora M, et al. (2005) Prevalence, service use, and demographic correlates of 12-month DSM-IV psychiatric disorders in Mexico: results from the Mexican National Comorbidity Survey. *Psychological Medicine* 35:1773–1783.
- Medina-Mora ME, Borges G, Benjet C, Lara C, y Berglund P (2007) Psychiatric disorders in Mexico: lifetime prevalence in a nationally representative sample. *The British Journal of Psychiatry* 190(6):521-528.
- Merali Z, Michaud D, McIntosh J, Kent P y Anisman H (2003) Differential involvement of amygdaloid CRH system(s) in the salience and valence of the stimuli. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 27(8):1201-1212.
- Miyamoto M y Nagawa Y (1977) Mesolimbic involvement in the locomotor stimulant action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rats. *European Journal of Pharmacology* 44(2):143-152.
- Müller, M. Z., S , Sillaber, I., Hagemeyer, T., Deussing, J., Timpl, P., Kormann, M., Droste, S., Kühn, R., Reul, J., Holsboer, F. y Wurst, W. (2003) Limbic corticotropin-releasing hormone receptor 1 mediates anxiety-related behavior and hormonal adaptation to stress. *Nat Neurosci* 6(10): 1100-1107.
- Ogasawara T, Itoh Y, Ukai Y, Yoshikuni Y y Kimura K (1996) NS-3, a TRH-analog, reverses memory disruption by stimulatinf cholinergic and noradrenergic systems. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 53:391-399.
- Pacak K y Palkovits M (2001) Stressor Specificity of Central Neuroendocrine Responses: Implications for Stress-Related Disorders. *Endocr Rev* 22(4):502-548.

- Palkovits M, Brownstein, M.J. (1988) Maps and guide to microdissection of the rat brain (Elsevier, New York).
- Pellow S, Chopin P, File SE y Briley M (1985) Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14:149–167.
- Price JL y Drevets WC (2009) Neurocircuitry of Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 35(1):192-216.
- Prokai L (2002) Central nervous system effects of thyrotropin-releasing hormone and its analogues. *Progr Drug Res* 59:133-169.
- Prut L y Belzung C (2003) The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology* 463(1-3):3-33.
- Refojo D y Holsboer F (2009) CRH Signaling: Molecular Specificity for Drug Targeting in the CNS. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1179(Glucocorticoids and Mood Clinical Manifestations, Risk Factors, and Molecular Mechanisms): 106-119.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, y Holmes A (1997) Animal models of anxiety: An ethological perspective. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30(3):289-304.
- Rodgers RJ y Dalvi A (1997) Anxiety, defence and the elevated plus-maze. *Neuroscience y Biobehavioral Reviews* 21(6):801-810.
- Roosendaal B, McEwen BS y Chattarji S (2009) Stress, memory and the amygdala. *Nat Rev Neurosci* 10(6): 423-433.
- Rosen JB, Cain CJ, Weiss SR y Post RM (1992.) Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 15(247–255).
- Sabban EL y Serova LI (2007) Influence of prior experience with homotypic or heterotypic stressor on stress reactivity in catecholaminergic systems. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress* 10(2):137-143.
- Sánchez E, et al. (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.
- Sandi C (2004) Stress, cognitive impairment and cell adhesion molecules. *Nat Rev Neurosci* 5:917-930.
- Santibañez M, Gysling K, y Forray MI (2006) Desipramine prevents the sustained increase in corticotropin-releasing hormone-like immunoreactivity induced by repeated immobilization stress in the rat central extended amygdala. *Journal of Neuroscience Research* 84(6):1270-1281.
- Sapolsky RM, Romero LM, y Munck AU (2000) How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocr Rev* 21(1):55-89.
- Sattin A, Pekary AE y Lloyd RL (1999) TRH in Therapeutic vs. Nontherapeutic Seizures: Affective and Motor Functions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 62(3):575-583.

Sawchenko PE, et al. (1996) The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res* 107:201-222.

Schulkin J, Gold WP y McEwen BS (1998) Induction of Corticotropin Releasing Hormone Gene Expression by Glucocorticoids: Implications for understanding the states of fear and anxiety and allostatic load. *Psychoneuroendocrinology* 23(3):219-243.

Schwabe L, Wolf OT, Oitzl MS. (2010) Memory formation under stress: Quantity and quality. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34: 584–591

Selye H (1950) The physiology and pathology of exposure to stress. A treatise based on the concepts of the general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. Montreal: Acta Inc.

Sharif N, Towle A, Burt D, Mueller R y Breese G (1989) Cotransmitters: differential effects of serotonin (5-HT)-depleting drugs on levels of 5-HT and TRH and their receptors in rat brain and spinal cord. *Brain Res* 480(1-2):365-371.

Sharif NA, Burt DR, Towle AC, Mueller RA y Breese GR (1983) Codepletion of serotonin and TRH induces apparent supersensitivity of spinal TRH receptors. *European Journal of Pharmacology* 95(3-4): 301-304.

Sharp T, et al. (1984) Analeptic effects of centrally-injected TRH and analogues of TRH in the pentobarbitone-anaesthetized rat. *Neuropharmacology* 23:339-348.

Shepard JD, Schulkin J, y Myers DA (2006) Chronically elevated corticosterone in the amygdala increases corticotropin releasing factor mRNA in the dorsolateral bed nucleus of stria terminalis following duress. *Behavioural Brain Research* 174(1):193-196.

Shian LR, Wu HM, Lin MT, y L.Y H (1985) Hypothalamic involvement in the locomotor stimulant or satiety action of thyrotropin-releasing hormone (TRH) and amphetamine. *Pharmacology* 30:259-265.

Shin LM y Liberzon I (2009) The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacology* 35(1):169-191.

Stanton TL, Beckman AL, y Winokur A (1981) Thyrotropin-Releasing Hormone Effects in the Central Nervous System: Dependence on Arousal State. *Science* 214(4521):678-681.

Stanton TL, Caine SB, y Winokur A (1992) Seasonal and state-dependent changes in brain TRH receptors in hibernating ground squirrels. *Brain Research Bulletin* 28(6):877-886.

Sterling P y Eyer J (1988) Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *Handbook of Life Stress, Cognition, and Health*, eds Fisher S y Reason JT (Wiley, Chichester), p 750.

Taché Y, Lis M, y Collu R (1977) Effects of thyrotropin-releasing hormone on behavioral and hormonal changes induced by b-endorphin. *Life Sciences* 21: 841-846.

Thompson B y Rosen J (2000) Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats *Neuropeptides* 34(1):38-44.

Treit D, Pinel J, y Fibiger H (1981) Conditioned defensive burying: a new paradigm for the study of anxiolytic agents. *Pharmacol Biochem Behav* 15(4):619-626

- Turnbull A y 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]):1-10
- van den Buuse M, Van Acker S, Fluttert M, y de Kloet ER (2002) Involvement of corticosterone in cardiovascular responses to an open-field novelty stressor in freely moving rats. *Physiology and Behavior* 75:207-215.
- Vogel RA, et al. (1980) Attenuation of the effect of punishment by thyrotropin-releasing hormone: comparisons with chlordiazepoxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212:153–161.
- Warne JP (2009) Shaping the stress response: Interplay of palatable food choices, glucocorticoids, insulin and abdominal obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 300(1-2):137-146.
- Watts AG (2005) Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. . *Front. Neuroendocrinol.* 26:109–130.
- Wigger A y Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. . *Physiol Behav.* 66(2):293-302
- Yamada M, et al. (1992) Differential regulation of thyrotropin-releasing hormone receptor mRNA levels by thyroid hormone in vivo and in vitro (GH3 cells). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 184:367-372.
- Yokoe T, et al. (1988) Corticotropin-Releasing Factor Levels in the Peripheral Plasma and Hypothalamus of the Rat Vary in Parallel with Changes in the Pituitary-Adrenal Axis. *Endocrinology* 123(3):1348-1354.