



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE PSICOLOGÍA

**PARTICIPACIÓN DE LA PIROGLUTAMIL
PEPTIDASA II EN LA REGULACIÓN DEL EJE
TIROIDEO BAJO LA ADMINISTRACIÓN AGUDA DE
ALCOHOL**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A:

DULCE CAROLINA RODRÍGUEZ LOZANO

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

¡Muchas gracias!

Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de ser parte de la comunidad universitaria, por brindarme una formación integral: académica, cultural y deportiva, por dejarme disfrutar el orgullo de ser puma. Por mi raza hablara mi espíritu.

Facultad de Psicología por prepararme en esta maravillosa profesión, por obsequiarme tan buenos profesores que generaron en mi miles de dudas y motivaciones, por avivar mí pasión por la conducta humana y las neurociencias.

Edith, por ser una científica admirable, comprometida y trabajadora, por tus innumerables enseñanzas que atesorare toda la vida, por abrirme las puertas de tu laboratorio así como las de tu corazón. Agradezco también al resto del personal del INPRFM, José Luis Calderón Camacho y Raúl Cardoso Gutiérrez por su apoyo técnico, al MVZ Mario Aguilar por su atención y cuidados en el bioterio, a Nash y Claudia por formar parte del equipo: "Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular".

Dr. Jean Louis Charli y Dra. Patricia Joseph, por permitirme conocer el sorprendente y apasionante mundo del IBT, por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mis evaluaciones. Gracias a la Q. Fidelia Romero Arteaga por su trabajo y colaboración en la optimización de los oligos para las PCR; y especialmente muchas gracias a ti, Iván (ahora Dr. En Ciencias) por ser mi maestro y entrañable amigo, te quiero mucho.

A los miembros de mi comité de jurados el Dr. Óscar Próspero García, el Dr. Hugo Sánchez Castillo y el Dr. Jaime Eduardo Calixto González; por la dedicación de su valioso tiempo en la lectura y análisis de este trabajo.

Mamá y Papá por su interminable amor, apoyo y enseñanzas, por demostrarme que la educación no solo se recibe en el aula, sino en la escuela de la vida; por ser mis grandes ejemplos a seguir. Los amo.

Mi Belen, mi hermana, compañera y amiga, por ser ese motorcito que me dice "¡Sigue adelante!", por compartir y dejarme compartir todas las emociones que nos da la vida. Te adoro.

A todos y cada una de las estrellas que me ha dado la vida, repartidas en mi familia, amigos y seres queridos, porque me han regalado semillitas que me convierte en una mejor profesionista y ser humano. Los quiero. Especialmente gracias a mis Danys y a ti Javier, forman parte de mi corazón.

Ahora, todos los que gusten acompañarme:

¡MÉXICO! ¡PUMAS! ¡UNIVERSIDAD!

¡GOYA! ¡GOYA!

¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!

¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!

¡GOYA!

¡¡UNIVERSIDAD!!

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN.....	8
CAPÍTULO I. PERSPECTIVA GENERAL DEL ALCOHOL.....	10
1.1. Antecedentes históricos y sociales del consumo de alcohol.	10
1.2. Metabolismo del alcohol.....	11
1.3. Efectos del consumo agudo de alcohol.	14
1.4. Efectos del consumo crónico de alcohol.....	16
1.5. Mecanismo de acción del alcohol.	17
CAPÍTULO II. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES.....	20
2.1. Sistema neuroendocrino	20
2.2. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	26
2.3. Función neuromoduladora de TRH.....	29
2.4. Biosíntesis de la Hormona liberadora de tirotrópina TRH.....	30
2.5. Degradación de TRH.....	31
2.6. Degradación de TRH por la Piroglutamil peptidasa II (PPII).....	34
2.7. Regulación de PPII en los tanicitos de la eminencia media	36
2.8. Efecto del alcohol sobre el eje tiroideo.....	39
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	41
3.1. Justificación	41
3.2. Variables.....	43
3.3. Objetivos:.....	43
3.3.1. Objetivo general:	43
3.3.2. Objetivos específicos:	43
3.4. Hipótesis:.....	44
3.4.1. Hipótesis específicas.....	44
CAPÍTULO IV. MÉTODO.....	45

4.1. Animales	45
4.2. Material	45
4.3. Diseño experimental y tipo de estudio.	45
4.4. Procedimiento experimental.	45
4.4.1. Inyección de etanol.	46
4.4.2. Extracción del tejido y preparación de las muestras.....	48
4.4.3. Cinética del etanol sobre RNAm de la piroglutamil peptidasa II.....	50
4.4.4. Análisis semicuantitativo de la señal densitométrica en soportes de agarosa	50
4.4.5. Determinación de la actividad específica de PPII.....	51
4.4.6.. Análisis estadístico	52
CAPÍTULO V. RESULTADOS.....	53
5.1. ARNm total obtenido a partir de animales experimentales y control	53
5.2. Estandarización del número de ciclos para la amplificación de genes problema y control por RT-PCR	53
5.3. Análisis de la señal del ARNm de PPII y TRH, por RT-PCR en ratas expuestas a una dosis aguda de alcohol	57
5.4. Análisis de la actividad específica de PPII en la eminencia media, area preóptica, núcleo dorsomedial y adenohipofisis en ratas expuestas a una dosis aguda de alcohol	61
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.....	65
CONCLUSIÓN	72
BIBLIOGRAFÍA:	73
ANEXO 1: Purificación de ARN total partiendo de tejidos congelados.....	83
ANEXO 2: Transcripción reversa.....	87
ANEXO 3: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	89
ANEXO 4: Actividad específica de PPII.....	93
a) Sonicación y centrifugación	93
b) Medida de la actividad enzimática de PPII	93
c) Cuantificación total de proteína.....	95

ABREVIATURAS

ACTH	Adrenocorticotropina
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADH	Hormona antidiurética
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ALDH	Acetaldehído deshidrogenasa
AP	Adenohipófisis
Apo	Área preóptica del hipotálamo
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BSA	Albúmina sérica bovina
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
D2	Desiodasa tipo 2
EM	Eminencia media
FSH	Hormona folículo estimulante
GH	Hormona del crecimiento
HHT	Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides
HMB	Hipotálamo mediobasal
Ip	Intraperitoneal
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LH	Hormona luteinizante
MEOS	Sistema microsomal oxidativo del alcohol
NDM	Núcleo dorsomedial del hipotálamo
NPV	Núcleo paraventricular del hipotálamo
NP	Neurohipófisis

PE	Prolin endopeptidasa
PPI	Piroglutamil peptidasa I
PPII	Piroglutamil peptidasa II
PRL	Prolactina
RIA	Radioinmunoensayo
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
SE	Sistema Endocrino
SN	Sistema Nervioso
SNC	Sistema Nervioso Central
T3	Triyodotironina
T4	Tiroxina
TRH	Hormona liberadora de tirotrópina
TRH-R	Receptor de la hormona liberadora de tirotrópina
TSH	Hormona estimulante de tirotrópina
UCP1	Proteína desacoplada 1

RESUMEN

Debido a su estructura molecular, el alcohol puede generar diversas alteraciones en el Sistema Nervioso, éstas pueden traducirse en un deterioro de la salud física, mental y social del individuo. Dentro los numerosos efectos que puede tener el alcohol se encuentra la alteración del eje tiroideo: un eje neuroendocrino que participa en el mantenimiento de la homeostasis metabólica a través de la síntesis de la hormona liberadora de tirotropina (TRH, piroGlu-His-ProNH₂) en núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). Las neuronas TRHérgicas liberan al péptido en el sistema portal hipofisiario para viajar a la adenohipófisis (AP), donde facilita la síntesis y liberación de la hormona estimulante de tirotropina (TSH) que al ser liberada a la circulación, controla la actividad de la glándula tiroides. Esta última glándula libera hormonas tiroideas y mediante retroalimentación negativa regulan la síntesis de TRH y TSH en el hipotálamo e hipófisis respectivamente. Se ha demostrado, que la liberación de TRH de las terminales nerviosas del NPV en la eminencia media (EM), es regulada por la actividad de la enzima piroglutamil peptidasa II (PPII) presente en células especializadas llamadas tanicitos. PPII es una ectopeptidasa altamente específica, que actúa como mecanismo principal de inactivación extracelular de TRH, al hidrolizar el enlace piroGlu-His de la hormona. Una dosis aguda de alcohol modifica la actividad y expresión de la PPII en regiones del sistema límbico como el hipotálamo en donde TRH juega un papel neuroendocrino y neuromodulador. Si bien la expresión y actividad de PPII aumentan en el hipotálamo, se desconoce los núcleos específicos donde se da esta respuesta

El objetivo de este trabajo fue elucidar si la PPII presente en los tanicitos de la EM es regulada por una administración aguda de alcohol. Para corroborar lo anterior se inyectó una dosis de alcohol (3g/kg) Ip. a ratas macho adultas. Se realizó la eutanasia a distintos tiempos entre las 12 y las 24 horas posterior a la inyección y se determinaron los niveles del mensajero de PPII (EM y AP) y de TRH (NPV) mediante RT-PCR; y la actividad específica de la enzima en EM, AP y otros dos núcleos hipotalámicos: el área preóptica (Apo) y el núcleo dorsomedial (NDM) mediante un ensayo fluorimétrico a partir de cortes de tejido congelado que contuvieron las zonas de interés.

Los resultados obtenidos sugieren un aumento transitorio en la síntesis de TRH (no se detectó a las 24 horas) a tiempos tardíos después de una dosis aguda de alcohol. En respuesta a este incremento, se elevan los niveles de síntesis de PPII y posteriormente su actividad enzimática en la EM. La actividad de PPII en el Apo y NDM no se vio afectada, mientras que el aumento de síntesis y actividad de PPII en la AP puede ser un mecanismo adicional en la modulación del eje. Se concluye que el aumento en la actividad de PPII localizada en los tanicitos de la EM puede promover la remoción del péptido (TRH) del sistema portal hipofisiario, y en consecuencia modular la función del eje tiroideo para contender con los efectos perniciosos de una dosis aguda de alcohol.

*Detrás de unos milivolts que atraviesan mi cerebro y
de una pequeñísima cantidad de ciertas sustancias,
se esconden emociones, pensamientos y conductas...
... se esconde mi universo.*

INTRODUCCIÓN

Hace aproximadamente 1500 millones de años, los organismos unicelulares se unieron (por alguna razón incierta) anatómica y funcionalmente para conformar organismos multicelulares, los cuales tuvieron que desarrollar mecanismos de intercomunicación y dirección celular. El no hacerlo, implicaría falta de coordinación de las diversas partes del organismo y su existencia estaría constantemente amenazada por la extinción. Con el transcurso de la evolución, actualmente todas las funciones de coordinación del reino animal se llevan a cabo a través del sistema nervioso (SN) y del sistema endocrino (SE), trabajando bajo estrecha interrelación y armonía (Dickerman, 1981; Bear, 2008; Rosler 2014).

El estudio de la neuroendocrinología permite entender procesos complejos que subyacen a fenómenos físicos y psicológicos, sin embargo, para mejorar el entendimiento de estos procesos es necesario comprender la comunicación de las unidades anatómicas y funcionales de este par de sistemas. En el SN la comunicación celular es regulada mediante señales eléctricas y bioquímicas. La comunicación química en el SN puede darse a través de los neurotransmisores clásicos y los neuromoduladores. Algunas de estas sustancias pueden ser de naturaleza peptídica (Charli y Joseph-Bravo, 2008). Por lo tanto, los neurotransmisores liberados en las terminales nerviosas pueden regular su acción por neuropéptidos que amplían o modifican sus efectos de múltiples maneras.

Por otra parte, el SE está constituido por glándulas que sintetizan y liberan hormonas al torrente sanguíneo para regular la función de ciertos células blanco. Las glándulas periféricas modulan su función en respuesta a las hormonas liberadas por la glándula hipófisis, que a su vez responde a la secreción hormonal proveniente del hipotálamo. Esta organización hipotálamo-hipófisis-glándulas periféricas conforma a los ejes neuroendocrinos.

Las hormonas tienen naturalezas químicas muy variadas en donde también se perfilan los péptidos como mensajeros. El reconocimiento de éstos empezó en la década de los 70's con el descubrimiento de los péptidos hipotalámicos. Dos grupos encabezados por Guillemin (1971) y Schally (1969), dilucidaron la piroGlu-His-ProNH₂, un péptido responsable de la liberación de TSH (por sus siglas en inglés Thyroid-stimulating hormone) en la adenohipófisis (AP). A esta molécula se le denominó hormona liberadora de tirotropina o TRH (en inglés Thyrotropin-releasing hormone) y de inmediato se le asignó un papel neuroendocrino al controlar al eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) o eje tiroideo. El papel neuromodulador de este péptido en diferentes regiones del SN se dilucidó tiempo después (Costall, 1979; Taylor, 1981; Biggins, 1983).

Un evento importante en la comunicación bioquímica del sistema neuroendocrino, es la inactivación de los neurotransmisores y neuromoduladores liberados al espacio extracelular. El principal mecanismo de inactivación de TRH es una ectoenzima altamente específica: la piroglutamil peptidasa II (PPII), capaz de hidrolizar el enlace peptídico piroGlu-His del TRH (Garat, 1985) y en consecuencia modular la actividad de esta molécula. Actualmente se conoce por diferentes estudios que la modulación de PPII puede afectar la transmisión TRHérgica y por tanto, su papel neuroendocrino o neuromodulador (Lazcano, 2010; Charli y Joseph-Bravo, 2008).

Nuestro equipo de trabajo ha corroborado la participación de la enzima PPII localizada en la eminencia media (EM) (estructura receptora de todos los botones terminales de neuronas TRH que controlan la actividad del eje tiroideo) como un mecanismo de regulación del eje HHT en condiciones que demandan una homeostasis energética, como es la exposición al frío (Sánchez, et. al., 2009) y el ayuno (Lazcano, 2015). Los trabajos anteriores permiten visualizar la regulación de PPII como un blanco farmacológico y terapéutico, sin embargo la participación de PPII como mecanismo de inactivación de TRH se extiende a otros paradigmas experimentales que deben ser aclarados. El presente estudio tuvo por objetivo estudiar la respuesta de PPII en la EM, bajo un fenómeno que a través de civilizaciones milenarias en todo el planeta, ha acarreado una serie de efectos adversos en la salud física, mental y social de las personas: el consumo de alcohol.

Capítulo I. Perspectiva general del alcohol.

1.1. Antecedentes históricos y sociales del consumo de alcohol.

El consumo de bebidas alcohólicas ha sido una constante de la humanidad y su proceso de obtención según Goodman y Gilman, (2011) se ha ido perfeccionando en paralelo con las civilizaciones. La historia del alcohol se extiende al menos desde la cultura egipcia en los años 6400 a. C., los rituales órficos de la Grecia Antigua o la metáfora del vino como la sangre de Cristo (Barona, 2003). A pesar de lo anterior, fue hasta la Edad Media cuando la tradición alquímica heredada por los árabes introdujo el término *alkul* para referirse al “espíritu del vino” que se apoderaban de las personas que abusaban de dicha sustancia.

El alcohol empleado para beber se obtiene mediante dos procesos: la fermentación y la destilación (Rodríguez, 2010; González, 2009). Desde los tiempos prehistóricos hasta el siglo XI de nuestra era, el consumo de alcohol se limitaba a procesos fermentativos sencillos y a partir de la Edad Media en Europa se introdujo la técnica árabe de la destilación y con ella la popularización de los productos alcohólicos (Barona, 2003). El empleo del alcohol se difundió en el siglo XVI cuando en algunos países europeos se concedió autorización a los gremios de destiladores, propagando su venta por plazas y mercados. Conjuntamente, las técnicas de destilación mejoraron y la variedad de productos alcohólicos aumentaron, se crearon espacios para reunirse a beber y una industria especializada en la elaboración de cerveza. Los hechos anteriores indujeron el consumo excesivo y agravaron los efectos perniciosos del alcohol, poniéndose de manifiesto como un problema médico-social (Houghton y Roche, 2001).

En el México prehispánico la bebida alcohólica que más se consumía era el pulque y en menor medida fermentaciones de maíz o peyote en las tribus de Aridoamérica. En esa época el consumo de alcohol no representaba un problema social debido a la grave penalización para aquellos que abusaban de este producto, y a la carencia de tecnología

para producir grandes cantidades o de medios de distribución (Mendieta, 1991). Fue hasta la época Colonial, cuando fueron introducidos los destilados y la elaboración de bebidas embriagantes por parte de los españoles con fines de lucro, que el alcoholismo comenzó a tomar carácter de alarmante en México (Calderón, 2003 y Mendieta, 1991).

En la actualidad, el consumo nocivo de bebidas alcohólicas causa 3.3 millones de muertes cada año a nivel mundial según reportes de la ONU. Lo anterior puede deberse al hecho de que el uso nocivo de alcohol es un factor causal en más de 200 enfermedades y trastornos, además una persona en estado de embriaguez puede lastimar a otros o ponerlos en peligro de sufrir accidentes de tránsito o actos de violencia, también puede perjudicar a sus compañeros de trabajo, familiares, amigos o extraños (ONU, 2015).

El desarrollo de patrones de consumo nocivo de alcohol está fuertemente influenciado por la historia familiar y la información genética de cada individuo. Existen diferencias genéticas en la sensibilidad del efecto reforzante del alcohol y sus efectos aversivos (Maldonado, 2003). Conjuntamente, los efectos del alcohol en un individuo están matizados por la interacción con factores subjetivos, como la situación en la que se bebe y la experiencia del propio individuo. La aceptación social y cultural de las bebidas alcohólicas en nuestro país, la alta tolerancia hacia los consumidores de estas y la concepción del alcoholismo como un fracaso moral y no como una enfermedad, han contribuido a la ingesta inmoderada de las bebidas embriagantes, a pesar de que son conocidos los graves efectos asociados al consumo de alcohol (González, 2009).

1.2. Metabolismo del alcohol.

En química se denomina alcohol a aquellos compuestos orgánicos que contienen el grupo hidroxilo (-OH) en sustitución de un átomo de hidrogeno, enlazado de forma covalente a un átomo de carbono. No obstante, la disposición y el consumo de etanol o alcohol etílico por ser el compuesto activo de las bebidas embriagantes, ha adaptado el concepto de alcohol para utilizarse como sinónimo de la molécula que consta de dos átomos de carbono, seis de hidrógeno y un átomo de oxígeno ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$) (Sánchez, Pérez, Castellano y Del Río, 2003).

El alcohol es consumido exclusivamente por vía oral, por tanto, la descripción que a continuación se presenta se hace considerando esta vía de administración. Es importante resaltar que independientemente del método utilizado para la obtención de las bebidas embriagantes y del distinto grado de alcohol que estas contienen (ver tabla 1), el tamaño de la ración se ajusta, de modo que un vaso de cerveza, una copa de vino o una cuba de destilado contengan entre 12 y 18 gramos de alcohol (Ayesta, 2002).

Tabla 1. Obtención y contenido alcohólico de las principales bebidas embriagantes.

Tipo de bebida	Procedimiento de obtención	Etanol en volúmen	Etanol en gramos por cada 100ml.
Cerveza	Fermentación de frutas o granos.	4%-6%	3.2-4.8g 1 lata/botella (355ml) = 13-15 g.
Vino	Fermentación de frutas o granos.	12%-14%	9.6-11g 1copa (100ml) = 10-11 g.
Cava/champan	Fermentación de frutas o granos.	12%	9.6g 1 copa (100 ml) = 10 g.
Anís	Destilación	35%	28g 1copa (50 ml) = 14 g.
Coñac, tequila	Destilación	37%-40%	29.6-32g 1 copa (50 ml) = 15-16 g.
Whisky, vodka, ron,	Destilación	40%-45%	32-36g 1 copa (50 ml) = 16-18 g.
Licores	Destilación	45%-70%	36-56g aperitivo menor a 30 ml= 16g-18 g.

El porcentaje en volúmen que aparece en el etiquetado, debe multiplicarse por 0.8 que es la densidad del alcohol, para obtener el equivalente en gramos. Así, una bebida que contiene "18% vol" significa que tiene 14.4 g de etanol por cada 100 ml. Obtenido y modificado de Macek, (2014).

Después del consumo de alcohol, éste se absorbe con rapidez al torrente sanguíneo. Aunque el alcohol puede acceder a nivel sanguíneo por cualquier estructura del tracto digestivo, éste se absorbe fundamentalmente en el intestino delgado (70-80%) y en el estómago (20-30%), debido a las microvelocidades que presentan ambos órganos. Posterior a la absorción del alcohol, éste se distribuye en el agua corporal total (Aragón, 2002).

El alcohol se metaboliza fundamentalmente por oxidación, transformándose en acetaldehído como se muestra en la figura 1. El primer paso en el metabolismo del alcohol ocurre a nivel hepático donde éste es convertido en acetaldehído por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), utilizando NAD (Nicotiamina-Adenina-Dinucleótido) como cofactor. Existen otros dos sistemas enzimáticos hepáticos que posibilitan esta misma reacción y que adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol, ya sea en bebedores crónicos o por alguna deficiencia en el sistema principal. Estos dos sistemas son llamados sistema microsomal oxidativo del etanol (MEOS) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrogeno (Compuesto I). Posteriormente el acetaldehído se transforma en acetato por la enzima acetaldehído deshidrogenasa (ALDH) y el acetato es transformado en Acetil-CoA para dar paso al ciclo de Krebs donde finalmente se convierte en dióxido de carbono (CO_2) y agua (H_2O) (Nelson y Cox, 2015).

La mayor parte de la eliminación del alcohol se produce por metabolismo, pero existe un escaso porcentaje de alcohol (1-10%) que es eliminado sin sufrir transformación alguna, mediante su incorporación a la orina, las heces el sudor y el aire exhalado. Existe una gran variabilidad en las velocidades y tasas de eliminación de alcohol entre diferentes sujetos por factores genéticos, consumo de azúcares, uso de anticonceptivos orales o tabaco, la capacidad metabólica de los bebedores crónicos e incluso se ha detectado un ritmo circadiano en la velocidad de desaparición del alcohol (Goodman y Gilman, 2011). A pesar de las diferencias, se suele considerar que la media de la población elimina entre 10 y 20 mg de alcohol/hora, por cada 100 ml de sangre (Aragón, 2002).

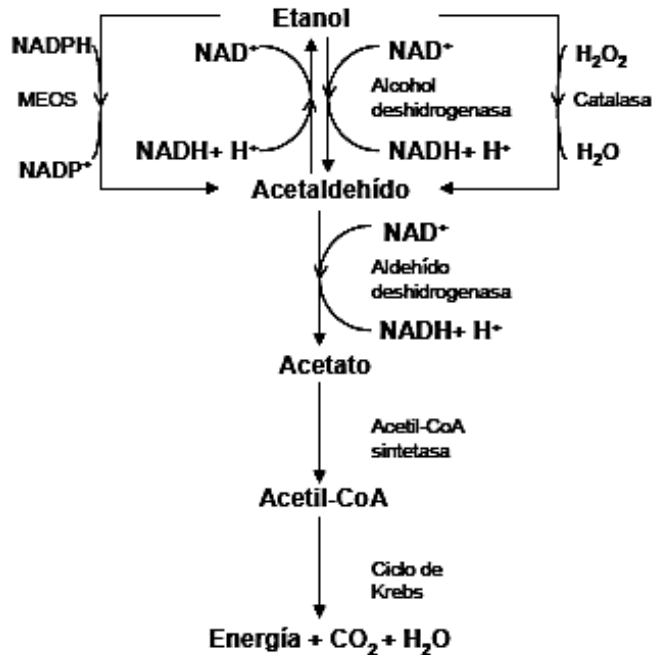


Figura 1. Biotransformación del alcohol por oxidación a acetaldehído. El alcohol es transformado en acetaldehído por la enzima ADH, después se transforma en acetato por la ALDH y finalmente en Acetil CoA para incorporarse al ciclo de Krebs. En los costados se pueden observar dos procesos de degradación extra del etanol, por el sistema MEOS y por la enzima catalasa peróxido de hidrogeno.

La molécula del alcohol etílico es pequeña y poco polar, por lo tanto interactúa fácilmente con grupos polares y no polares de los componentes membranales con capacidad de difusión en medio acuoso y lipídico. Esto explica la capacidad del alcohol de penetrar en todas las células del organismo y repartirse en diferente proporción en los tejidos del cuerpo, generando así efectos fisiológicos en los sistemas que conforman al ser humano. A continuación se describirán algunos efectos del consumo inmoderado agudo y crónico del alcohol para finalizar con su mecanismo de acción en el SN.

1.3. Efectos del consumo agudo de alcohol.

El consumo agudo de alcohol se refiere a la intoxicación etílica, un síndrome clínico producido por el consumo de bebidas alcohólicas de forma brusca y en cantidades superiores a la tolerancia individual de una persona en una ocasión (Izquierdo, 2002). En

la tabla 2 se resumen los efectos físicos y psicológicos de un consumo agudo de etanol a través de varias concentraciones de alcohol en sangre.

Tabla 2. Efectos de varias concentraciones sanguíneas de alcohol.

Número de “tragos”	Alcohol en la sangre (%)	Efectos físicos y psicológicos
1	0.02-0.03	Sin efectos evidentes. Ligera elevación del estado de ánimo.
2	0.05-0.06	Sensación de relajación, calor, disminución de tiempo de reacción.
3	0.08-0.09	Alteración ligera del equilibrio, del habla, de la visión y el oído. Sensación de euforia: pérdida de la coordinación motora fina.
4	0.10-0.12	La coordinación y el equilibrio se dificultan; alteración de las facultades mentales y el juicio.
5	0.14-0.15	Alteración mayor del control físico y mental: habla y visión difíciles.
7	0.20	Pérdida del control motor (requieren ayuda); confusión mental.
10	0.30	Intoxicación severa: control consciente mínimo
14	0.40	Inconsciencia: umbral del estado de coma.
17	0.50	Coma profundo.
20	0.60	Muerte por falla respiratoria.

Se muestran los efectos físicos y psicológicos dependiendo las concentraciones sanguíneas de alcohol, en personas no habituadas al alcohol, con un intervalo entre cada bebida de al menos 60 minutos. Un trago se refiere al equivalente a una bebida estándar. Tomado y modificado de Brailowsky (1995).

La consecuencia inevitable de una intoxicación etílica es la resaca conocida coloquialmente como “cruda” , que se presenta en forma de irritación de la mucosa gástrica, dolor de cabeza y sed intensa. La resaca es más prevalente en bebedores de consumo bajo y moderado de alcohol que en personas con un consumo crónico (Izquierdo, 2002).

1.4. Efectos del consumo crónico de alcohol.

El consumo crónico de alcohol se refiere a un consumo continuo por largo plazo, la mayoría de las ocasiones en cantidades elevadas. Es importante no confundir el consumo crónico de alcohol con el diagnóstico de alcoholismo o dependencia al alcohol, debido a que este último se caracteriza por ser una conducta adictiva (González, 2009). Aun cuando el consumo crónico de alcohol está ampliamente distribuido en la población mexicana, solo un pequeño sector cumple los criterios del CIE-10 o el DSM-V para diagnosticar dependencia alcohólica.

No es posible considerar el consumo crónico de alcohol como nocivo para la salud de manera rotunda, existen algunas excepciones. Por ejemplo, el consumo de 20 a 30g diarios de alcohol se ha asociado con un papel cardioprotector por el decremento (10-40%) de cardiomiopatía coronaria que puede generar (Goodman y Gilman, 2011). No obstante, un consumo dañino de alcohol genera efectos perniciosos en varios tejidos, órganos e incluso sistemas del cuerpo. De los efectos nocivos del alcohol destacan cardiomiopatías e hipertensión (Ladero, 1998), fallas en el sistema digestivo (Goodman y Gilman, 2011; Carroll, 2000), diuresis, decremento de la fuerza muscular, alteraciones del funcionamiento sexual en hombres y mujeres (Ladero, 1998; Carroll, 2000) y debilitamiento del sistema inmunitario (ONU, 2015).

De las secuelas importantes del consumo crónico de alcohol, resaltan las alteraciones en la anatomía y fisiología cerebral que además pueden contribuir a la progresión de la adicción (Alfonso-Loeches y Gurri, 2011). Se ha observado en bebedores crónicos efectos tan variados como la disminución de masa y metabolismo cerebral (Ladero, 1998; Carroll, 2000), apoplejías de origen hemorrágico, complicaciones neurológicas, neuropsicológicas o psiquiátricas (Brailowsky, 1995). Las alteraciones del SN que el alcohol produce, puede inducir alteraciones en la expresión genética, mecanismos moleculares y celulares (Ayesta, 2002).

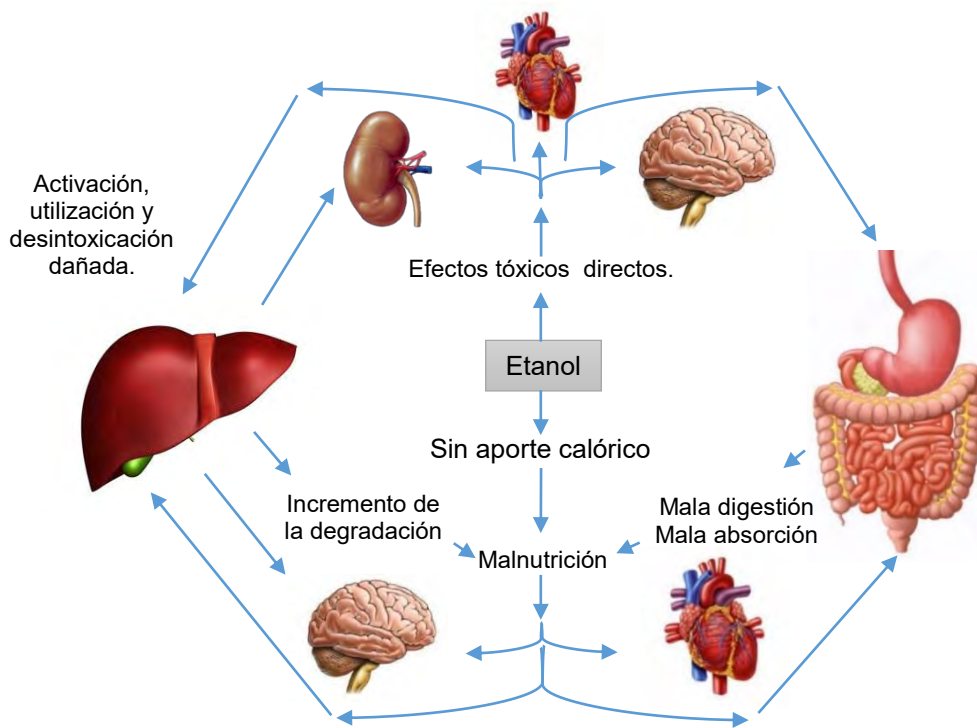


Figura 2. Principales órganos afectados por el consumo nocivo de alcohol. Tomado y modificado de Pomares (2013).

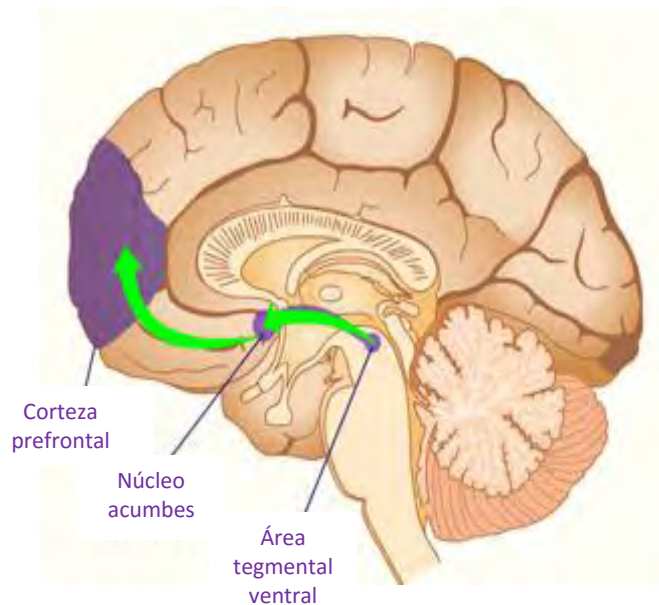


Figura 3. Circuito de la recompensa. La activación de estas estructuras genera una sensación placentera después de realizar una actividad. Las proyecciones dopaminérgicas del área tegmental ventral están dirigidas hacia el núcleo accumbens y a su vez pueden inhibir la actividad de la corteza prefrontal. Tomado y modificado de Villar (2011).

1.5. Mecanismo de acción del alcohol.

El alcohol en el cerebro, establece una compleja y no del todo conocida relación con los sistemas de neurotransmisión y neuromodulación, ya que no afecta de modo exclusivo a alguno de estos (Rodríguez, 2010). Un gran número de resultados experimentales sugieren que el alcohol ejerce efectos muy variados en el SN dependiendo del tiempo y el patrón de ingesta de la bebida, sin embargo, de manera general el alcohol es un depresor del Sistema Nervioso Central (SNC) (Carlson, 2006). Esto puede deberse a su interacción con dos receptores específicos: el receptor GABA_A y el receptor NMDA del glutamato (Ayesta, 2002). El alcohol potencia la acción del GABA y antagoniza la acción del glutamato, es decir, el alcohol potencia al inhibidor (GABA) e inhibe al excitador (glutamato) (Ayesta, 2002; Goodman y Gilman, 2011).

La acción similar del alcohol, las benzodiazepinas y barbitúricos sobre los receptores GABA_A explica los efectos ansiolíticos del alcohol, la ataxia y disminución de reflejos como se ve en dosis elevadas (>250 mg/dl), por lo que una intoxicación etílica o barbitúrica son potencialmente mortales (Ayesta, 2002). Mientras que el efecto del alcohol sobre el receptor NMDA puede inhibir la LTP (por sus siglas en inglés long-term potentiation), sustrato neurofisiológico de los procesos de aprendizaje y memoria (Givens y McMahon, 1995; Zorumski, Mennerick, Izumi, 2014).

Por otra parte, la administración de drogas adictivas, como el alcohol, estimula el sistema o circuito de recompensa cerebral al aumentar los niveles extracelulares de dopamina del área tegmental ventral y sus proyecciones hacia el núcleo accumbens (Ayesta, 2002) (figura 3), esto puede traducirse en una alteración de los circuitos y receptores neuronales, por lo que una persona necesitará cada vez más estimulación para conseguir el mismo nivel de placer que estos generaban originalmente; lo mismo para aliviar los estímulos desagradables que les acarrea su carencia (Rodríguez, 2010).

El área tegmental ventral es regulada a su vez por la actividad de neurotransmisores como GABA, glutamato (proveniente de la corteza cerebral y el tálamo) y serotonina cuyas proyecciones se extienden desde el núcleo del rafe (Rodríguez, 2010). Los sistemas dopaminérgico y serotoninérgico tienen un papel

relevante en los mecanismos iniciales de preferencia por el alcohol que más tarde conducen al establecimiento y mantenimiento de la adicción (Rodríguez, 2010; Engleman, Rodd, Bell y Murphy, 2008). Otro neurotransmisor comprometido en el mecanismo de acción del alcohol es la acetilcolina. Los receptores nicotínicos (NACH) para acetilcolina constituyen también una diana de la acción de esta droga. Se ha indicado que la nicotina (que actúa sobre el receptor NACH) y el etanol ejercen un efecto sinérgico en los procesos de refuerzo relacionados con los hábitos de tabaquismo y alcoholismo (Clark y Little, 2004).

La lista de moléculas afectadas por los efectos del alcohol no está restringida a los neurotransmisores clásicos. Por ejemplo, al sistema canabinoide y los opioides β -endorfina están implicados en los mecanismos de refuerzo y recompensa relacionados con la ingesta de alcohol. Dicha implicación se ha encontrado tanto en vías alternativas a la dopaminérgica como en vías dependientes de la liberación de dopamina (Lawrence, 2010; Freund, Katona y Piomelli, 2003).

Finalmente, el mecanismo de acción del alcohol también se extiende a los componentes del sistema neuroendocrino. Los primeros estudios sobre este tema comenzaron por observaciones de similitudes entre pacientes alcohólicos y con un deterioro endocrino, lo que permitió crear la hipótesis de que algunas hormonas podrían participar en la neurobiología del alcohol (Niubó, Rodríguez, Gorguet, y Cardona, 1999). En el siguiente capítulo se presentará un panorama general del sistema neuroendocrino para concentrarse al final del mismo en el eje tiroideo, sus componentes, fisiología y modulación en respuesta al alcohol.

CAPÍTULO II. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES

2.1. Sistema neuroendocrino

La homeostasis (ὅμος = similar y στάσις = estado o estabilidad) es la capacidad de los seres vivos para autorregularse y conservar una condición interna estable, compensando los cambios en su entorno mediante respuestas adaptativas, con el fin de mantener la salud y vida del organismo. Cada estructura de un individuo, desde una célula hasta un sistema completo desempeña un importante papel en la homeostasis general. Sin embargo, es el sistema neuroendocrino en los organismos del reino animal, el encargado de coordinar el equilibrio dinámico que conlleva la homeostasis.

Los primeros conocimientos de endocrinología se remontan a la edad antigua, con la creencia de que ciertas sustancias sanguíneas denominadas “humores” determinaban cambios en el estado de salud de un individuo, las emociones y la conducta (Dickerman, 1981). Sin embargo, el conocimiento del sistema endócrino (ἐνδο = dentro; κρίνω = secreto) comenzó formalmente a mitad del siglo XIX con Walter Canon, quien aplicó el término de homeostasis por primera vez para describir la constancia del *medio interno* propuesto por Claud Bernard. Este último es considerado el padre de la fisiología moderna, por demostrar que la vida depende del medio interno para proveer todas las condiciones fisicoquímicas que mantienen el funcionamiento adecuado de las células de un organismo. Por lo tanto, la estabilidad de los seres vivos depende de su capacidad de homeostasis.

Años después se descubrió que los mecanismos homeostáticos de un organismo se regulan mediante la secreción de ciertas sustancias denominadas *hormonas* (del verbo griego ὀρμάω = excitar o poner en movimiento) al torrente sanguíneo. Dichas hormonas provienen de un conjunto de glándulas que conforman al SE. Las hormonas se transportan en cantidades muy pequeñas a puntos específicos de acción, donde regulan reacciones metabólicas y desencadenan respuestas apropiadas para el

mantenimiento del organismo. La mayoría de las hormonas se encuentran circulando todo el tiempo, aunque su concentración puede ser mayor o menor en determinado momento, dependiendo de las necesidades del organismo, es decir, sigue un mecanismo autorregulatorio (Dickerman, 1981; Joseph-Bravo y De Gortari, 2008).

Una vez sentados los fundamentos de la endocrinología, a principios del siglo XX, fue posible estudiar las relaciones entre el cerebro y las hormonas, analizando no solo el control neuronal sobre el SE, sino también el control endócrino sobre la actividad del SN. Originalmente los investigadores más destacados en este campo consideraban que la hipófisis, no tenía ninguna función sobre el SE. Esta idea se modificó hasta 1927, cuando Philip Smith demostró un retardo en el crecimiento y atrofia del hígado, bazo, riñones, glándulas tiroideas y suprarrenal, debido a la pérdida del lóbulo anterior de la hipófisis y la reversión de estos cambios mediante la implantación de tejido hipofisario (Dickerman, 1981).

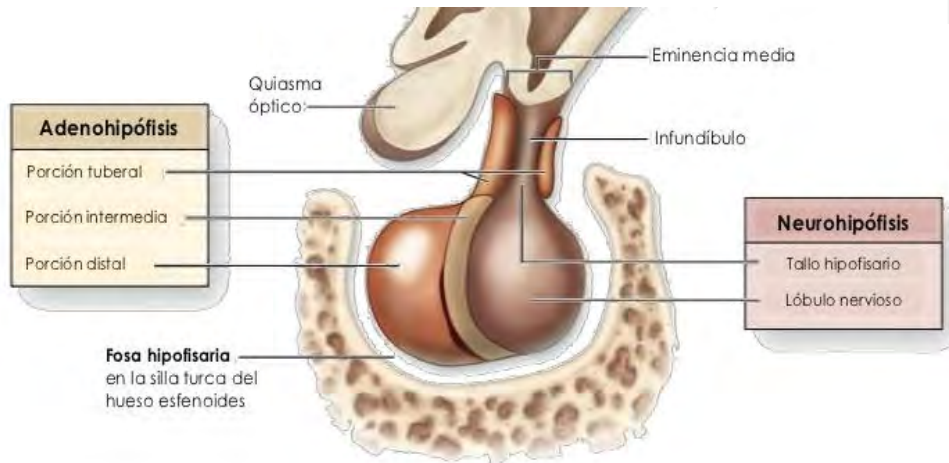
La hipófisis se localiza en la base del cráneo, en una cavidad ósea denominada silla turca del hueso esfenoides (ver figura 4a). Desde el punto de vista anatómico, embriológico y funcional la hipófisis se divide en dos porciones: anterior (adenohipófisis) y posterior (neurohipófisis), separadas por la *pars* intermedia. La adenohipófisis de origen no neurogénico procede embriológicamente de la bolsa de Rathke, comprende el 80% del volumen de la glándula y es responsable de la secreción de diversas hormonas, de las cuales destacan seis por su relevancia fisiológica en el organismo: hormona del crecimiento (GH), luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), prolactina (PRL), adrenocorticotropina (ACTH) y tirotropina (TSH). La porción posterior de la hipófisis tiene un origen embrionario diferente al del resto de la glándula, al ser una evaginación del piso del tercer ventrículo del diencefalo y quedar unida al hipotálamo a través del tallo o infundíbulo hipofisario. La neurohipófisis (NP) no sintetiza en si hormonas, se limita a almacenar los productos de secreción del hipotálamo: oxitocina y vasopresina, también conocida como hormona antidiurética (ADH) (Ver figura 4b) (Bear, 2008).

Para 1930, se habían caracterizado varias de las hormonas hipofisarias descritas en el párrafo anterior y reconocido el papel integrador de la pituitaria como el director de la orquesta endócrina. No obstante, evidencias clínicas y farmacológicas posteriores,

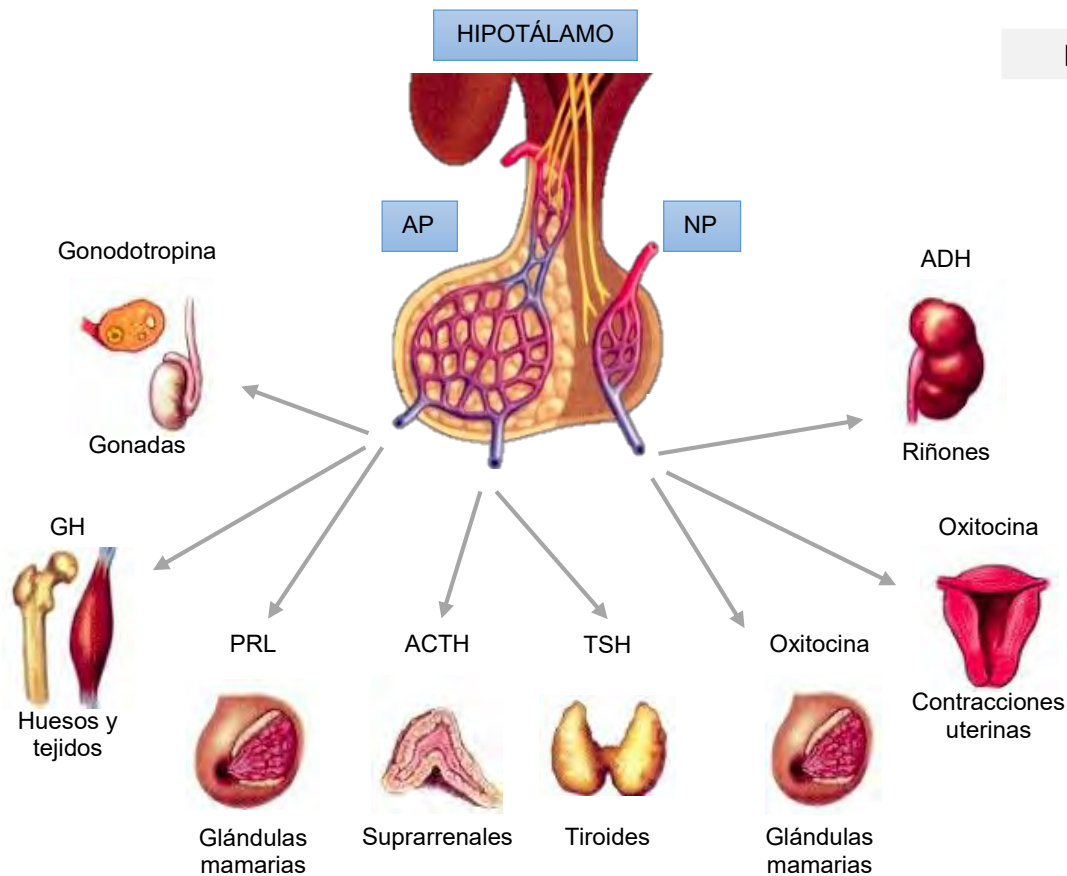
pusieron de manifiesto la hipótesis de que el cerebro era el controlador de la hipófisis a través de una conexión funcional entre el hipotálamo y la AP (Flerko, 1971; Dickerman, Kedzik, Gelato, Chen, y Meites, 1974). La identificación de como se establece dicha conexión no fue un proceso fácil (Joseph-Bravo, Cote y Perez, 2006).

Los estudios de microscopía electrónica revelaron que la AP casi no tiene fibras nerviosas, de tal manera que se descartó una conexión neuronal directa con el cerebro en esta porción de la pituitaria (Dickerman, 1981). En contraste, Green y Harris (1947) demostraron que el enlace funcional entre cerebro y AP está constituido por una red de capilares denominados sistema portal hipotálamo-hipofisiario. Después de la remoción de la AP, comprobaron que la función del sistema se restablecía sí trasplantaban la glándula a nivel de una pequeña zona abultada denominada eminencia media del hipotálamo (figura 4a), al alcance de los vasos del sistema portal hipotálamo-hipofisiario donde nace el lóbulo posterior de la hipófisis.

Investigaciones posteriores mostraron un cambio en la secreción de las hormonas hipofisarias, generado por extractos hipotalámicos. Dichas evidencias dieron origen a una nueva hipótesis: el control neurohumoral sobre la función de la AP. Se postuló que las neuronas del hipotálamo secretaban agentes químicos hacia los vasos portales, llegando hasta la AP, controlando así su actividad de síntesis y secreción hormonal (Harris, 1972). Sin embargo, la concentración tan baja de dichas sustancias en el sistema portal hacía imposible detectarlas por métodos químicos convencionales (Dickerman, 1981).



a)



b)

Figura 4. Anatomía y fisiología de la glándula hipófisis. a) La hipófisis desciende del hipotálamo, se localiza en la fosa hipofisaria y se divide en adenohipófisis (AP) y neurohipófisis (NP). b) Control hormonal de la hipófisis sobre glándulas periféricas. La porción anterior fabrica y secreta hormonas reguladoras (FSH, LH, GH, PRL, ACTH y TSH) que se dirigen a las células blanco de estructuras periféricas. La porción posterior está conectada con el hipotálamo y mediante un transporte axonal secreta oxitocina y ADH, sin producir alguna de estas.

En la década de 1950, el Dr. Salomón Berson y la Dra. Rosalyn Yalow desarrollaron la técnica del radioinmunoensayo (o abreviado RIA del inglés Radioimmunoassay). De esta manera, se pudieron detectar hormonas en concentraciones de nanogramos o picogramos en sangre y otros líquidos corporales (Berson y Yalow, 1967). Esta nueva técnica contribuyó para que los doctores Roger Guillemin y Andrew Schally aislaran en 1969 la primera hormona hipotalámica con función reguladora sobre la AP. Durante este trabajo, ambos investigadores utilizaron varios cientos de miles de hipotálamos ovinos y porcinos para obtener finalmente algunos miligramos de una hormona hipotalámica parcialmente purificada y que posteriormente se identificó como un tripéptido: pyroglutamil-histidil-prolinamida, la hormona liberadora de tirotrina o TRH (Schally, Redding, Bowers, y Barrett, 1971). Con estos resultados fue posible comprobar la teoría del control neurohumoral de la AP y encontrar el nexo entre el SN y el SE. Por sus esfuerzos, los doctores Guillemin, Schally y Yalow recibieron el Premio Nobel de Medicina en 1977, por encontrar “el eslabón perdido entre el cuerpo y el alma” (Luft, Comité Nobel, citado en Dickerman, 1981).

Actualmente, el hipotálamo se considera el “comandante en jefe” del Sistema Neuroendocrino y del Sistema Nervioso Autónomo, ya que coordina las funciones vinculadas con el mantenimiento de la especie a través de estos sistemas. El hipotálamo se localiza en la región ventral del diencefalo que rodea a la cavidad del tercer ventrículo; pesa alrededor de 4g en el ser humano. A pesar de su tamaño, es una estructura subcortical formada por núcleos neuronales especializados (figura 5) capaces de integrar información de diferentes partes del SN: sistema reticular, corteza cerebral, hipocampo, amígdala y tálamo; con aferencias dopaminérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas, glutamatérgicas y GABAérgicas. Ante las señales recibidas, el hipotálamo da una respuesta autónoma por medio de eferencias al tronco encefálico y la médula espinal, para influir en los centros segmentarios simpáticos y parasimpáticos; y/o una respuesta endocrina mediante eferencias a la hipófisis para mantener la homeostasis del organismo. Además notifica al tálamo, corteza cingulada y formación reticular del estado interno del organismo (Rosler, 2014).

Las células secretoras que conforman los núcleos del hipotálamo pueden ser magnocelulares o parvocelulares. Las neuronas magnocelulares se encuentran en mayor proporción tanto en el núcleo paraventricular (NPV) como en el núcleo supraóptico y como el nombre lo indica son de mayor tamaño; producen hormonas neurohipofisarias, que a través del tracto hipotálamo-hipofisiario o haz tubero-hipofisiario llegan a la hipófisis posterior, en donde son almacenadas, para después ser vertidas en la sangre. Las células parvocelulares liberan hormonas (FSH, LH, GH, PRL, ACTH y TSH) denominadas factores hipofisiotrópicos a los capilares del plexo primario del sistema porta hipofisiario en la EM, donde viajan al plexo secundario en la AP, para estimular la secreción de hormonas hipofisarias y así controlar a su vez a las glándulas periféricas (González, 1999, Bear, 2008).

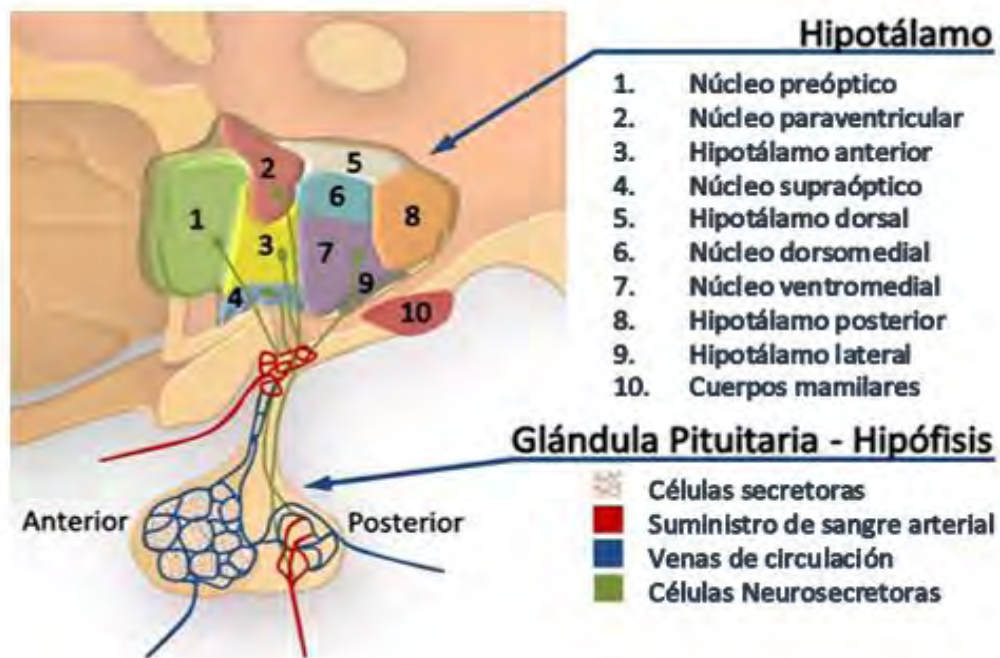


Figura 5. Principales núcleos hipotalámicos. Se pueden observar las proyecciones del tracto hipofisiario a la hipófisis posterior y el transporte endocrino por los capilares del sistema portal hipofisiario a la hipófisis anterior provenientes de los núcleos hipotalámicos. Tomado y modificado de Rosler (2014).

Los mecanismos de control neuroendocrinos, se establecen mediante mecanismo de retroalimentación. Así, el hipotálamo estimula la secreción de las hormonas hipofisarias en respuesta a estímulos externos e internos para activar al resto de las

glándulas; estas últimas pueden secretar a su vez otras hormonas capaces de regular la actividad del hipotálamo e hipófisis, de tal manera que se establecen circuitos denominados ejes neuroendocrinos: hipotálamo-hipófisis-glándula periférica. El organismo es regulado principalmente por tres ejes neuroendocrinos: el eje gonadal, el eje adrenal y el eje tiroideo. Cuando se produce un desequilibrio interno por varias causas, estos procesos se activan para reestablecer dicho equilibrio (Guyton y Hall, 2011).

Por último, las hormonas liberadas por el sistema neuroendocrino pueden afectar tejidos y órganos diferentes de los que conforman a los ejes, como áreas cerebrales distintas al hipotálamo; lo que se traduce en cambios conductuales en el organismo (Wong, y Álvarez, 2013).

2.2. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

El eje tiroideo o eje hipotálamo-hipófisis-tiroides es regulado por el péptido que le dio el Nobel a Guillemin y Schally en 1977, la hormona liberadora de tirotropina. (Ver imagen 6). TRH es sintetizado en poblaciones parvocelulares del NPV del hipotálamo y escasamente en neuronas magnocelulares. Las células parvocelulares del NPV proyectan sus terminales axónicas a la EM, en donde liberan al péptido activo hacia la AP a través de los vasos capilares del sistema portal hipofisiario (Nilni y Sevarino, 1999).

En la adenohipófisis TRH estimula la síntesis y liberación de tirotropina o TSH tras unirse a su receptor TRH-R1. Este último pertenece a la familia de los receptores acoplados a proteína G, formado por siete dominios transmembranales; TRH se une a TRH-R1 y activa vías de transducción de señales y respuestas celulares pertinentes para la liberación de TSH al torrente sanguíneo y de ahí a su célula blanco, la glándula tiroides. En la tiroides, TSH estimula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas, en diferente proporción. Aproximadamente el 80% del producto liberado de la tiroides es tiroxina (T4), mientras que el 20% restante corresponde a triiodotironina (T3), la forma activa de la hormona. Las hormonas tiroideas llevan a cabo sus efectos sobre tejidos blanco mediante

la unión a receptores de hormonas tiroideas (por sus siglas en inglés TR's), codificados por distintos genes los cuales, por *splicing* alternativo generan cuatro receptores funcionales denominados TR α 1, TR α 2, TR β 1 y TR β 2 (Fekete y Lechan, 2014), localizados de manera heterogénea en órganos como hipófisis, cerebro, hígado, riñón, tejido adiposo, musculo esquelético y cardiaco (Yen, 2001; Flamant, et. al., 2006).

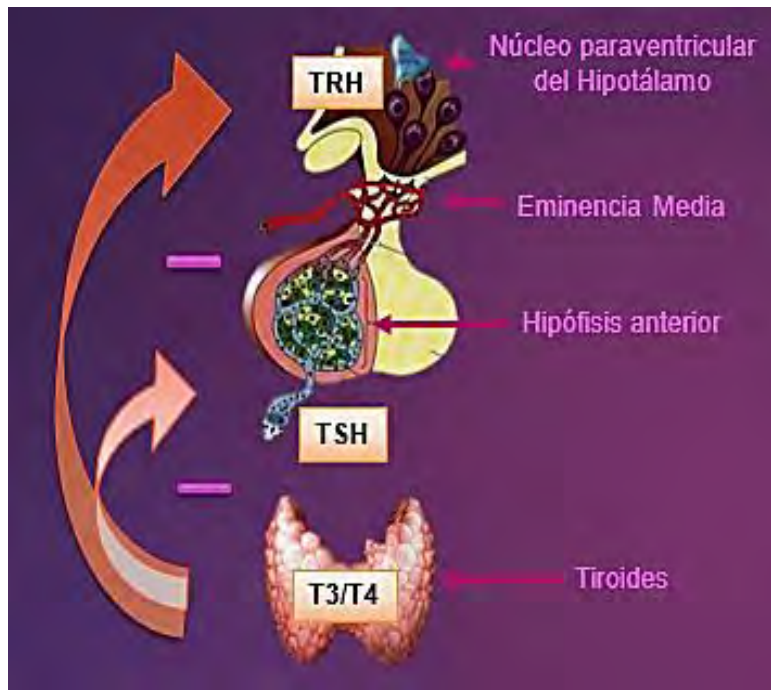


Figura 6. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El TRH es sintetizado en el núcleo NPV del hipotálamo; ante un estímulo fisiológico, las terminales nerviosas de estas neuronas ubicadas en la EM liberaran al péptido al sistema portal, lo que permite que sean transportadas a la AP, donde inducen la liberación de TSH, que al ser secretada llega a la tiroides y estimula la liberación de T3 y T4. Las hormonas tiroideas pueden retroalimentar negativamente al eje regulando la síntesis y liberación de TSH y TRH.

Cuando la concentración de hormonas tiroideas se encuentra disminuida en la circulación, la síntesis de TRH y TSH aumentan en el hipotálamo y la hipófisis respectivamente, para mantener las hormonas tiroideas constantes. Por el contrario, si las hormonas en la circulación se encuentran elevadas, estas inhiben la síntesis de TRH y TSH ya que al aumentar los niveles de T3 y T4 se ejerce un efecto de retroalimentación negativa tanto en el NPV como en la AP. El receptor TR β 2 se sintetiza en las neuronas TRH del NPV y es el encargado de regular de forma negativa la actividad del eje tiroideo

mediante la inhibición de la expresión del gen de TRH; TR β 2 también inhibe la expresión de los genes que codifican para las subunidades α y β que conforman a TSH (Fekete y Lechan, 2014).

La sobrevivencia de los seres vivos depende de su capacidad de regular el catabolismo de los alimentos para obtener energía (ATP) necesaria para procesos vitales como la actividad eléctrica en el cerebro, la actividad cardíaca, la generación del calor corporal, etc. Esta regulación está a cargo principalmente del eje tiroideo y del eje adrenal, por lo que el funcionamiento óptimo de células secretoras de TRH y CRH (por sus siglas en inglés, corticotropin releasing hormone) en el NPV debe garantizar la regulación del influjo energético a los procesos metabólicos que permitan a los individuos contender con el metabolismo basal (procesos vitales) y con las necesidades cambiantes del día (Joseph-Bravo y De Gortari, 2008).

La función principal del eje tiroideo es regular la homeostasis energética del organismo a través de las hormonas tiroideas responsables del 20 al 25% del gasto energético basal (o en reposo) y de regular la termogénesis al modular la expresión de la proteína desacopladora 1 (UCP1) en tejido graso y músculo, que permite la generación de calor. La termogénesis obligada es la síntesis de energía basal necesaria para realizar las funciones vitales, sin embargo, cuando se presenta un estímulo extremo como la exposición a frío, se activa el eje tiroideo, generando una termogénesis adaptativa, es decir, la producción adicional de calor en respuesta a esta condición, con el propósito de mantener la energía y/o temperatura basal del organismo (Lechan y Fekete, 2007; Klieverick, et. al., 2009). La regulación del metabolismo no solo sucede en respuesta al estrés fisiológico por frío, sino en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes y restricción alimentaria (Lazcano, 2015), e incluso en condiciones de estrés psicológico (Joseph-Bravo y De Gortari, 2008).

Por su parte, el aumento transitorio de cortisol liberado por las suprarrenales en respuesta a la activación del eje adrenal, incrementa la concentración de glucosa en sangre que permite al organismo contender con algún estímulo estresante. Además de la regulación endocrina, se libera adrenalina en respuesta a la activación del sistema

simpático para estimular la vía de la glucólisis de los músculos, la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo y la termogénesis (Nelson y Cox, 2015) (Ver figura 7).

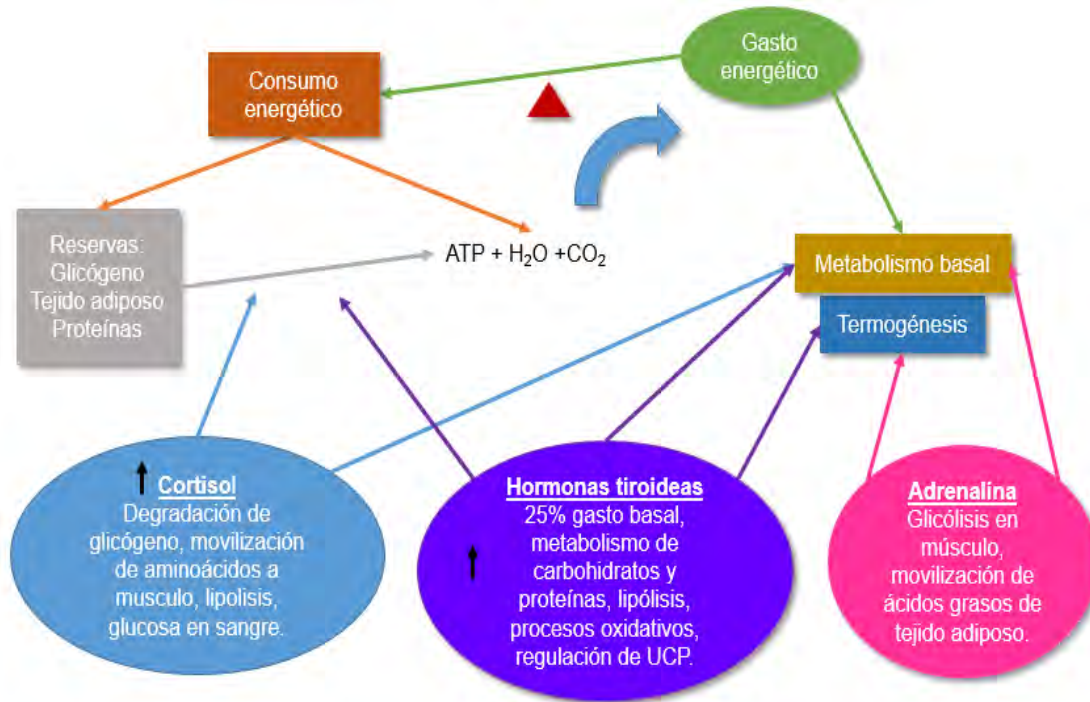


Figura 7. Regulación del metabolismo. El balance energético de un organismo es el equilibrio entre la energía adquirida a través del consumo de alimentos y la utilización de la misma en el metabolismo diario (gasto). El eje tiroideo y adrenal por medio de las hormonas tiroideas y el cortisol respectivamente, participan en la regulación del catabolismo de las biomoléculas adquiridas en la dieta (flechas verdes y moradas), para asegurar el influjo energético que demandan las necesidades diarias del organismo (metabolismo basal). Además de las vías neuroendocrinas participa el sistema simpático al estimular la liberación de adrenalina (flechas azules). En condiciones extremas como la baja disponibilidad de nutrientes o una exposición al frío, los mecanismos previamente descritos se reajustan para asegurar la homeostasis energética del organismo. Tomado y modificado de Joseph-Bravo y De Gortari (2008).

2.3. Función neuromoduladora de TRH

Alrededor del 70% de TRH del cerebro se encuentran en el hipotálamo, sin embargo, presenta una amplia distribución en regiones extra-hipotalámicas, por lo que se le ha relacionado con una función neuromoduladora. El ARNm de pro-TRH está distribuido ampliamente en diferentes regiones del SNC como en los núcleos basolateral y posteromedial de la amígdala, el núcleo reticular y la estría terminal del tálamo, así como en la zona granular del giro dentado del hipocampo, corteza frontal, núcleo

acumbens, septum, tallo cerebral, cerebelo, bulbo olfatorio, núcleo motor dorsal del vago, núcleo del rafe y médula espinal (Sattin, Pekary y Lloyd, 1999; Nillni y Sevarino, 1999). En estas regiones se ha descrito un papel neuromodulador asociado a funciones de tipo antidepresivo, analgésico, anticonvulsivo, analéptico, diaforético, facilitación de la memoria, excitabilidad de las motoneuronas, hipertensivo, termogénico, anorexigénico y vasoconstrictor, además de un papel reconocido en el mejoramiento de la cognición (Horita, 1998; Heuer, et. al., 1998; Charli, et. al., 1998; Nillni y Sevarino, 1999; Nillni, 2010, Lazcano, 2010; Vargas, 2013). Por lo tanto, se puede considerar que la regulación de TRH podría ser blanco para el desarrollo farmacológico de sustancias que regularán su papel neuroendocrino y neuromodulador (Charli y Joseph-Bravo, 2008).

2.4. Biosíntesis de la Hormona liberadora de tiotropina TRH

La biosíntesis de TRH puede estar regulada a nivel transcripcional tanto por factores de transcripción (AP-1, SP1, STAT3, pCREB) como por factores neurotróficos (BDNF) o receptores a hormonas: glucocorticoides, hormonas tiroideas, estrógenos, etc. (Hollener, et. al., 1995; Guissouma, et. al., 2000; Joseph-Bravo, et. al., 2006; Lechan y Fekete, 2006). Estos factores activan el gen de TRH conformado en la rata por tres exones y dos intrones, que luego de un proceso de edición o *splicing* alternativo generan un precursor de alto peso molecular (Balkan, et. al.; 1998).

En la figura 8 se puede observar el procesamiento del TRH, el cual comienza con la traducción del ARNm para su proteína precursora, una proteína de gran tamaño (pre-proTRH), por el complejo ribosomal en el retículo endoplasmático rugoso. El precursor de TRH, prepro-TRH, es un péptido de 23.9 KDa compuesto por 5 copias progenitoras de TRH en la rata y el ratón, aminoácidos básicos Lys-Arg o Arg-Arg que flanquean a las secuencias progenitoras y péptidos crípticos que en su conjunto forman una proteína de entre 227-256 aminoácidos dependiendo de la especie (Nillni y Sevarino, 1999). Después de la síntesis del precursor continua la proteólisis del precursor mientras es transportado por trans-Golgi a gránulos secretores inmaduros, los cuales posteriormente maduran; la

mayoría de ellos son enviados a los gránulos de secreción en las terminaciones axónicas (Bear, 2008).

La formación de la molécula activa de TRH, ocurre posterior a la acción de las enzimas convertasas PC1 y PC2 (protein convertasas), que escinden los residuos de aminoácidos básicos pares del proTRH (Friedman et. al. 1995). Los ARN's mensajeros de PC1 y PC2 coexisten en distintas proporciones con el ARNm de TRH en el NPV, aunque el porcentaje celular que expresa a una u otra convertasa difiere (Sánchez, et. al., 1997). Posteriormente, la enzima carboxipeptidasa-E remueve estos residuos de aminoácidos cortados, seguido de la amidación de la secuencia Glu-His-Pro-Gly por parte de la enzima PAM (glycina α -amidating monooxygenase), la cual utiliza al C-terminal de la glicina (Gly) como donador del grupo amida. El proceso finaliza con la ciclización de la glutamina (Glu), por parte de la enzima glutamil ciclasa dando por resultado un péptido maduro que será liberado de las terminales axónicas de las neuronas que lo sintetizan en el NPV, pero que proyectan a la EM para posteriormente ser transportado a la AP, donde ejercerá su acción (Charli y Joseph-Bravo, 2008).

2.5. Degradación de TRH

La eficiencia de la transmisión sináptica a través de péptidos depende de diferentes variables como la tasa de secreción de los péptidos, de los mecanismos de traducción a nivel del receptor y de la velocidad de eliminación del péptido. Se ha descrito que la degradación enzimática es un mecanismo necesario responsable de regular la señal de TRH una vez liberado al medio extracelular.

Dos enzimas citosólicas pueden degradar al TRH *in vitro*: la proli endopeptidasa (PE; EC 3.4.21.26) y la piroglutamil aminopeptidasa I (PPI; EC 3.4.11.8) (O'Leary y Connor, 1995). La PE es una enzima de tipo serina proteasa que tiene un peso molecular de 70KDa. Esta enzima hidroliza un amplio espectro de sustratos por el carboxilo terminal de la prolina (con excepción del enlace Pro-Pro). Por su parte, la PPI es una enzima de tipo cisteina proteasa monomérica de peso molecular variable (de 22 a 60 KDa, dependiendo de la fuente) y un pH óptimo entre 6.5 y 8.5. La PPI hidroliza un amplio

espectro de sustratos con residuo pGlu en el extremo amino terminal. Estos sustratos incluyen a TRH, GnRH, neurotensina y otros sustratos sintéticos de rata, hígado de la rata, corteza cerebral y riñón humano (Cummins y O'Connor, 1998).

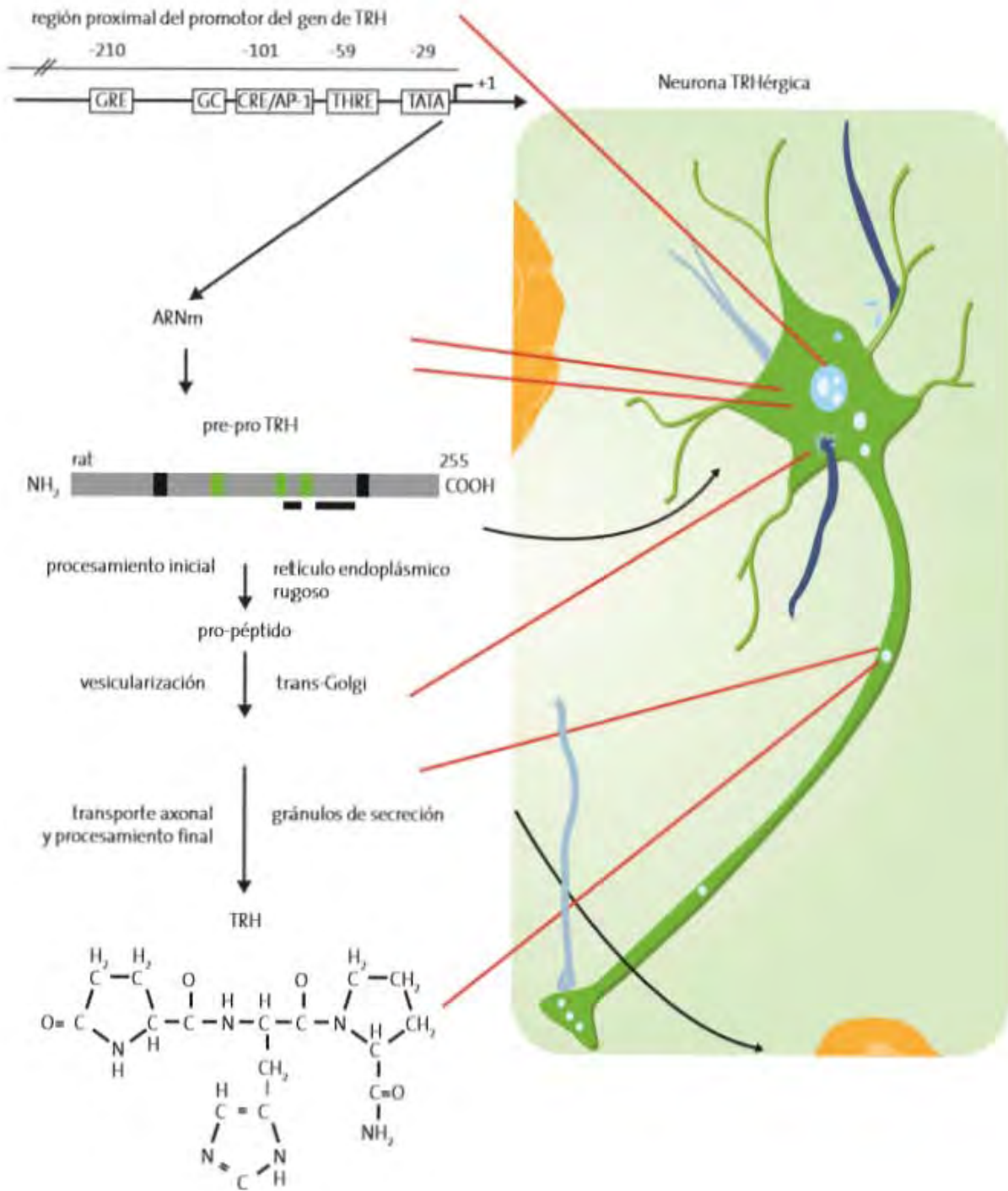


Figura 8. Biosíntesis del TRH en el sistema nervioso central. En la parte derecha se muestra el esquema de una neurona TRHérgica del NPV (en verde) con algunas terminales nervosas (en azul claro y azul marino) haciendo contacto sináptico sobre ella. Arriba a la izquierda, parte del promotor del gen de TRH con la identificación de algunos elementos de respuesta a factores transcripcionales. Abajo a la izquierda, el procesamiento del precursor del TRH en la vía de secreción regulada. Imagen tomada y modificada de Charli y Joseph-Bravo (2008).

Hace algunas décadas se identificó y purificó a partir de suero de rata, una enzima que hidroliza el enlace peptídico entre el pGlu-His de TRH. Esta enzima es inhibida por quelantes de metal (lo que sugiere que es una metalopeptidasa). Su actividad es óptima a un pH neutro y tiene un peso molecular de 260KDa, un peso mucho mayor que la PPI. Estudios llevados a cabo para determinar su especificidad mostraron que esta enzima es altamente específica para TRH (Bauer y Nowak, 1981). A consecuencia de tal especificidad, esta enzima es llamada “Tiroliberinasa” (TRH también es conocido como tiroliberina). Friedman y Wilk, (1985) comprobaron que en suero el TRH es degradado principalmente por la tiroliberinasa, por lo que se sugiere que *in vivo*, la tiroliberinasa inactiva al TRH en el sistema portal hipofisario, en donde el péptido entra en contacto con la sangre posterior a su liberación por terminales de neuronas TRH en la EM (Charli et. al., 2006).

2.6. Degradación de TRH por la Piroglutamil peptidasa II (PPII)

A finales de la década de los 70, el grupo de investigación de Joseph-Bravo (1979) trabajó con membranas sinaptosomales de cerebro de rata e identificó una actividad enzimática óptima a pH neutro, capaz de inactivar al TRH. Dicha actividad corresponde a una hidrolasa que corta el enlace peptídico piroGlu-His de TRH (de igual manera que la PPI y la tiroliberinasa). A este enzima se le denominó piroglutamil peptidasa II: PPII (EC 3.4.19.6) (O’Connor y O’Cuinn, 1984; Garat et. al., 1985) (Ver figura 9).

Cabe mencionar que la tiroliberinasa y la PPII son codificadas a partir del mismo gen, pero por mecanismos aun no descritos una forma se libera al espacio extracelular, mientras que la otra se queda embebida en la membrana plasmática (Schmitmeiner, Thole, Bader, y Bauer, 2002). La secuencia proteica de esta enzima ha podido ser deducida a partir del ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) de la PPII demostrando que es una ectopeptidasa dependiente de zinc, inhibida cuando se agregan quelantes de metal (Bauer et. al., 1981). La secuencia de PPII corresponde a una proteína integral de membrana tipo II de 1025 aminoácidos en la rata y 1024 aminoácidos en el humano con la siguiente topografía: una pequeña región N-terminal intracelular con un

sitio potencial de fosforilación por proteínas cinasas C (PKC), una región transmembranal, una gran región extracelular con la secuencia consenso His-Glu-x-x-His y un segundo Glu separado por 18 aminoácidos característicos de las zinc metalopeptidasas. El dominio extracelular también incluye al dominio carboxilo terminal, un dominio catalítico y 12 sitios posibles de N-glicosilación (Schauder et. al., 1994; Chavez-Gutierrez et. al., 2005).

La piroglutamil peptidasa II es una enzima de alta especificidad que hidroliza péptidos no mayores a 4 aminoácidos y con secuencias muy parecidas a las de TRH: pGlu-X-Y o Z, donde **X** puede ser Histidina (His), un aminoácido aromático o neutro, **Y** puede ser Prolina (Pro), Alanina (Ala) o Triptófano (Trp) y **Z** puede ser Pro-NH₂, Pro-Gly, ProβNA o ProMCA (Wilk y Wilk, 1989; Elmore et. al., 1990; Kelly et. al., 2000).

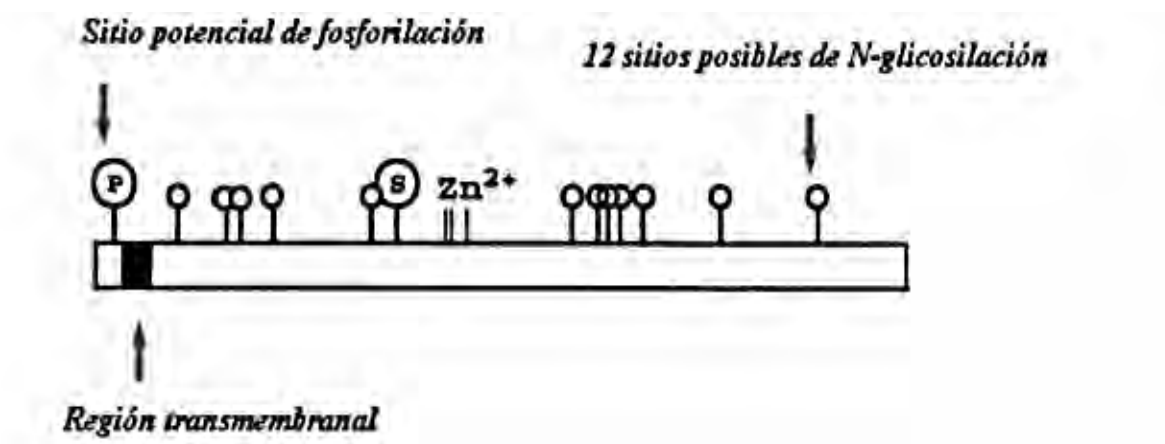


Figura 9. Topografía de la PPII deducida a partir de la secuencia de un DNAc de la PPII. La enzima tiene una región intercelular N terminal pequeña, una región transmembranal y un dominio C-terminal dirigido hacia el espacio extracelular donde se encuentra un sitio catalítico. P: Sitio posible de fosforilación. Tomado y modificado de Schauder et. al. (1994).

En el cerebro se ha demostrado que la distribución de PPII es heterogénea ya que algunas regiones como el bulbo olfatorio, el hipotálamo, la corteza cerebral y el hipocampo cuentan con mayor actividad enzimática; mientras que en la médula espinal y la AP la actividad es muy baja (Vargas, et.al., 1992). Se ha observado que la distribución del mensajero de PPII coincide con el mensajero de uno de los receptores de TRH (Charli,

et. al., 1998; Heur et. al., 2000), lo que sugiere que PPII muestra una topología estratégica para reconocer al TRH e hidrolizarlo en el espacio extracelular (Ver figura 10). Por lo tanto, la modulación de PPII podría ser un factor adicional que regule las sinapsis del cerebro donde el TRH ha mostrado múltiples efectos farmacológicos (Gary et. al., 2003).

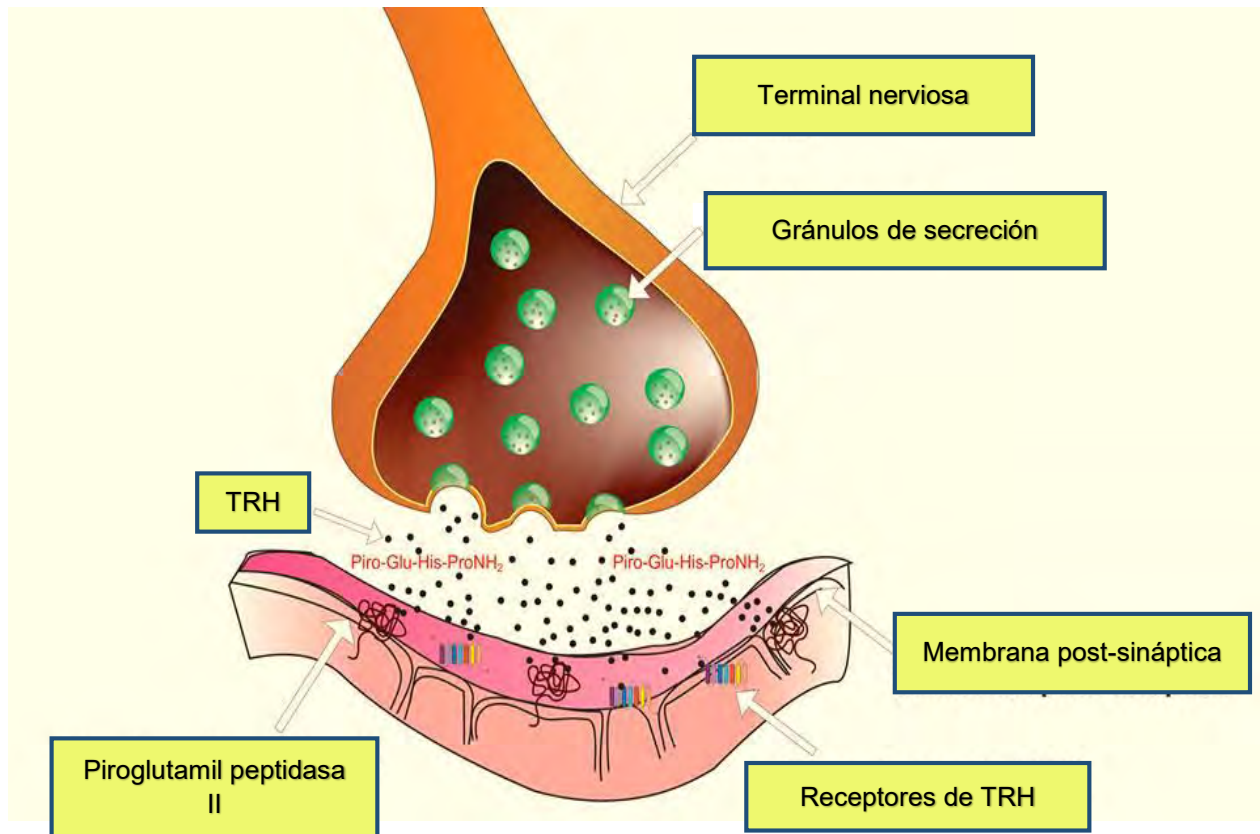


Figura 10. Esquema de una sinapsis TRHérgica. Se observa la terminal nerviosa repleta de gránulos de secreción que contienen al péptido (en verde), la membrana post-sináptica (en rosa), y el espacio sináptico donde el TRH se difunde una vez liberado, interacciona con sus receptores y es inactivado por la piroglutamil peptidasa II. Imagen tomada y modificada de Charli y Joseph-Bravo (2008).

2.7. Regulación de PPII en los tanicitos de la eminencia media

El SN no solo está constituido por neuronas, sino también por células de sostén denominadas neuroglia o células gliales. Según su ubicación en el SN, las células gliales pueden ser clasificadas en glía periférica y central (Ver figura 11). Dentro del sistema central se localiza una membrana delgada llamada epéndimo que reviste los espacios

lLENOS de líquido cefalorraquídeo (LCR) del cerebro y la médula espinal. En 1954, Horstmann describió unas células gliopendimales localizadas en el piso del tercer ventrículo, por encima de la EM del hipotálamo y las llamo tanicitos (del griego τανυσσ = elongación). Se trata de células bipolares que conectan el LCR a los capilares portales y que pueden transportar sustancias químicas desde el LCR hasta el sistema portal hipofisiario.

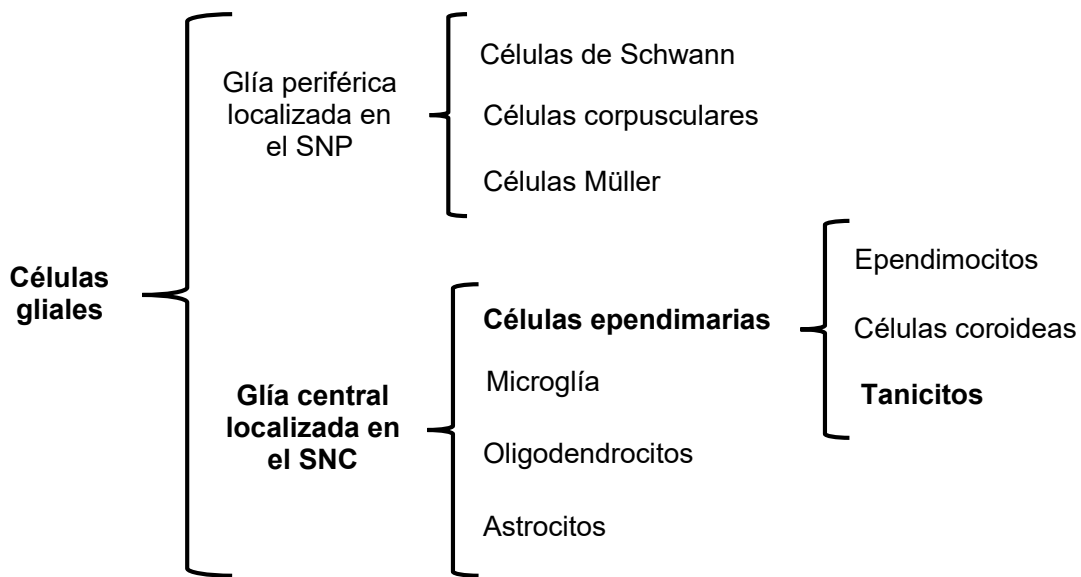


Figura 11: Clasificación de las células gliales de acuerdo a su distribución en el SN.

Durante el periodo perinatal la mayoría de la glía radial o microglía llega a transformarse en astrocitos, sin embargo una subpoblación de glía radial llega a diferenciarse en tanicitos, un linaje de células que durante su desarrollo comparte algunas propiedades con los astrocitos y con la glía radial, pero que en el estado maduro, muestra características morfológicas y moleculares únicas y distintivas. Los tanicitos no constituyen una población celular homogénea, se han descrito cuatro tipos de tanicitos: $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 1$, $\beta 2$ (Ver imagen 12) que presentan características diferentes con respecto a su ubicación, su relación espacial, morfología, citoquímica, ultraestructura y ciertas funciones. Por ejemplo las extensiones de los tanicitos $\alpha 1$ contactan al núcleo dorsomedial, los $\alpha 2$ contactan al núcleo ventromedial, la subpoblación $\beta 1$ contacta a las

neuronas del núcleo arcuato y la β_2 contactan a los capilares del sistema porta-hipofisario de la EM (Rodríguez, et. al., 2005), en donde se demostró mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica un contacto con las terminales axónicas que liberan a TRH (Sánchez, et al., 2009).

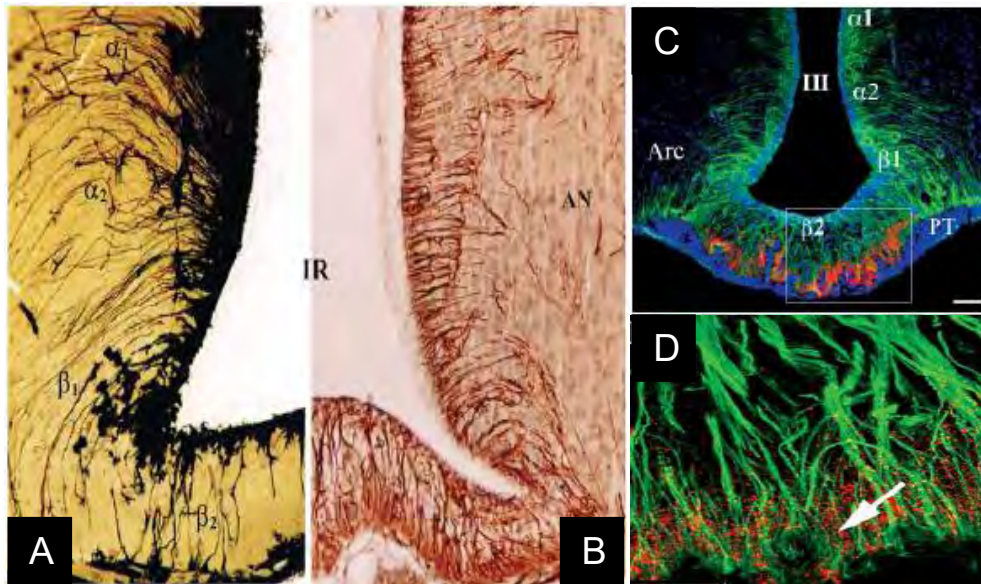


Figura 12. Distribución espacial de las diferentes poblaciones de tanicitos y su contacto con TRH. **A)** Se muestra mediante una tinción de Golgi la presencia de los tanicitos alrededor del tercer ventrículo y sus prolongaciones dirigiéndose hacia diferentes zonas del hipotálamo. **B)** Tinción con vimentina (proteína expresada por los tanicitos). Imágenes modificadas de Rodríguez et. al. (2005). **C)** Se muestra mediante una inmunofluorescncia a vimentina (verde) la distribución de los tanicitos y pro-TRH (rojo). **D)** Las terminales axónicas que contienen pro-TRH están asociados con las proyecciones de los tanicitos β_2 . Imágenes modificadas de Sánchez, et. al. (2009).

Los tanicitos β_2 de la EM están enriquecidos con elementos regulatorios del eje tiroideo, como trasportadores de hormonas tiroideas, TR's, desiodasas tipo D2 y D3 (enzimas catalizadoras de la conversión de T4 a T3 y de T4 a T3r, respectivamente) y terminaciones nerviosas que liberan otras neurohormonas cuyo blanco es la hipófisis (Rodríguez, 2005). Además, en esta zona se observó que la actividad y expresión de la enzima PPII es regulada positivamente por hormonas tiroideas y negativamente por hipotiroidismo (Bauer, et al., 1987; Schomburg y Bauer, 1995) (Ver figura 13). Lo anterior comprueba que la enzima no solo se localiza en neuronas sino en poblaciones celulares

de regiones estratégicas en donde la degradación del péptido, previo a que alcance a su célula blanco, podría jugar un papel determinante en la respuesta fisiológica del organismo ante un daño para mantener la homeostasis, como sucede animales sometidos a un estrés por frío (Sánchez, et al., 2009) o en ayuno (Lazcano, 2015).

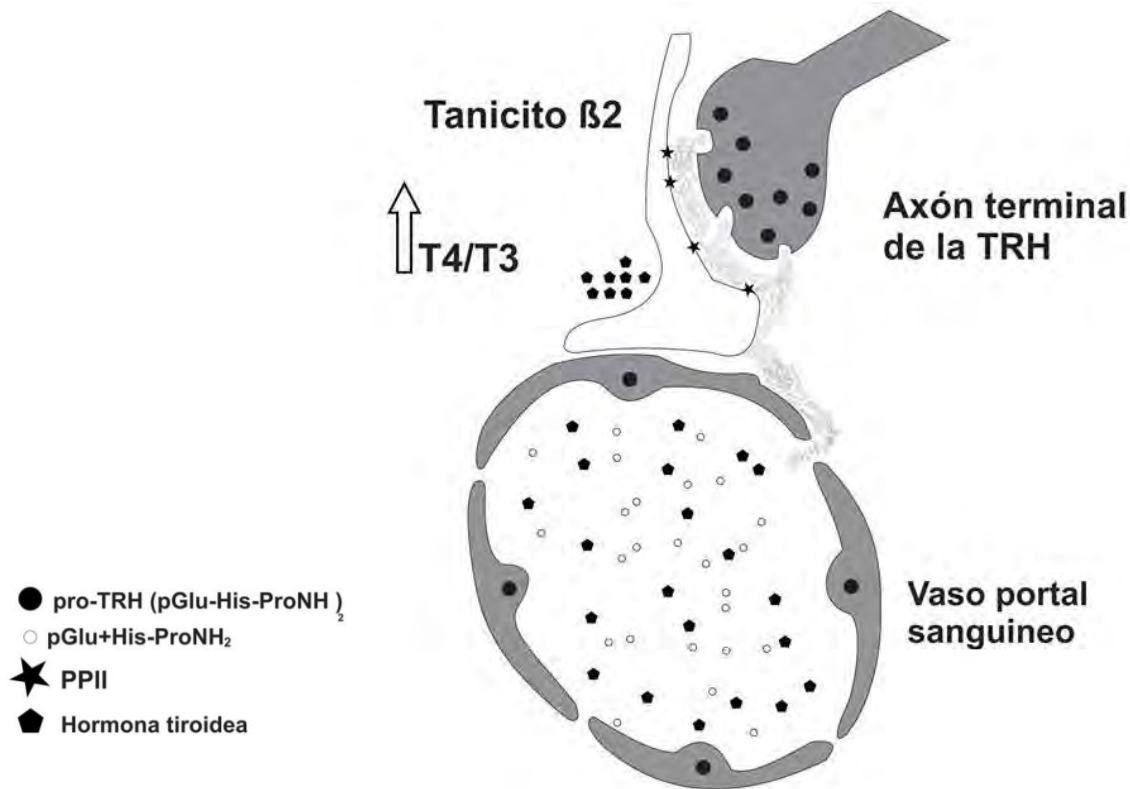


Figura 13: Regulación de TRH por la PPII de tanicitos β2. El esquema integra los datos experimentales que muestran que la PPII de tanicitos β2 en la EM, regula la cantidad de TRH que llegará a la AH, y por lo tanto controla la secreción de TSH. El aumento de los niveles de T3/T4 circulantes, ejercen un efecto de retroalimentación negativo sobre el HPT, incrementando la expresión del ARNm de la PPII en la EM. Imagen modificada de Sánchez, et. al., (2009).

2.8. Efecto del alcohol sobre el eje tiroideo

De manera general el consumo crónico de alcohol puede generar alteraciones en los ejes neuroendocrinos a nivel de síntesis, almacenamiento y liberación de hormonas, así como en los mecanismos de retroalimentación y acción hormonal (Niubó, Rodríguez, Gorguet y Cardona, 1999; Thaller, et. al., 2003). No obstante, los efectos del alcohol sobre

el sistema neuroendocrino comienzan a presentarse desde un consumo agudo, por ejemplo alteraciones los niveles de ACTH, PRL, cortisol, testosterona y hormonas tiroideas (Frías, Rodríguez, Torres, Ruiz y Ortega, 2000).

Tras analizar específicamente al eje HHT, se ha observado que la administración de alcohol genera un grado agudo de hipotermia en los animales y el hombre, el cual se revierte tras administrar TRH. Zoeller y Rudeen (1992) demostraron que el estado de hipotermia generado por una administración aguda e intraperitoneal (ip.) de alcohol en ratas, estaba determinado por su efecto sobre el eje tiroideo al decrementar los niveles hormonales de T3 y T4, 6 horas después de la administración. El decremento de las hormonas tiroideas puede ser un reflejo de la disminución de los niveles séricos de TSH a tiempos cortos (1 hora) en respuesta a una administración aguda de alcohol (De Gortari, 2000).

A nivel central una administración aguda de alcohol provoca un aumento en los niveles de ARN mensajero (ARNm) de TRH en el NPV a tiempos cortos. Esta regulación se observó independientemente de la condición tiroidea de cada organismo: hipotiroidismo, hipertiroidismo o eutiroidismo (Zoeller, et. al. 1992, 1994). De acuerdo con lo anterior se ha reportado una disminución del contenido de TRH en las terminales axónicas de la EM, indicando un aumento en la liberación del péptido.

Considerando que el TRH liberado al espacio extracelular es inactivado por la ectopeptidasa PPII, de Gortari y colaboradores (2005), demostraron que la administración ip. de una dosis aguda de alcohol modifica la actividad de PPII (a tiempos cortos) en diferentes regiones del SN en las que la actividad de las neuronas TRHérgicas es regulada. La mayoría de estos cambios, preceden cambios en la expresión del ARNm de PPII en el mismo sentido. También demostraron que la actividad de PPII en el hipotálamo, aumenta de forma tardía (24h), posterior al aumento en la expresión de su ARNm, lo que sugiere un papel particularmente regulatorio de PPII en esta región que podría ayudar al organismo a mantener la homeostasis del cuerpo bajo una administración aguda de alcohol.

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN, OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

3.1. Justificación

El consumo inmoderado de alcohol es una problemática mundial asociada a un deterioro de salud física y mental, una elevada tasa de mortalidad; y un costo familiar y social muy alto. No conforme, los estudios realizados por la directora del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” (INPRFM), concluyen que en México el pronóstico sobre el consumo de alcohol seguirá incrementando, debido al aumento de la población vulnerable y la tendencia a agudizarse los factores de riesgo derivados de las transiciones sociales (Medina-Mora, et.al., 2001). Por lo tanto, entender el mecanismo de acción de esta droga sobre SN para mejorar las estrategias de prevención y tratamiento, se ha convertido en una prioridad en las ciencias de la salud.

Convencionalmente en psicología se han analizado estudios sobre la preferencia y efectos del consumo de alcohol enfocándose en sistemas de neurotransmisión clásica, sin embargo, deben incorporarse bases neuroendocrinas para tener una visión integral de este fenómeno, ya que estas pueden traducirse en cambios conductuales, cognitivos y emocionales en el organismo. En consecuencia, el presente trabajo pretende ser un estudio pionero en la Facultad de Psicología que demuestre el papel homeostático del organismo, particularmente del eje tiroideo bajo una administración aguda de alcohol; para generar una aportación a la Psiconeuroendocrinología del alcohol.

La regulación del eje tiroideo por la capacidad hidrolítica de la enzima PPII sobre el TRH liberado en la EM hacia la AP, en condiciones de estrés por frío (Sánchez, 2009) y ayuno (Lazcano, 2015), nos permiten considerar que la modulación del eje HHT en respuesta a una dosis aguda de alcohol puede deberse a la modulación de esta misma enzima. Estudios preliminares de nuestro equipo de trabajo, demostraron por hibridación *in situ* (no publicado), un aumento en la expresión del mensajero de PPII en los tanicitos de la EM posterior a una administración aguda de alcohol. Así como un aumento en los valores séricos de TSH en animales a los que se les administró una dosis aguda de alcohol respecto a los animales a los que se les inyectó un vehículo con solución salina (figura 14).

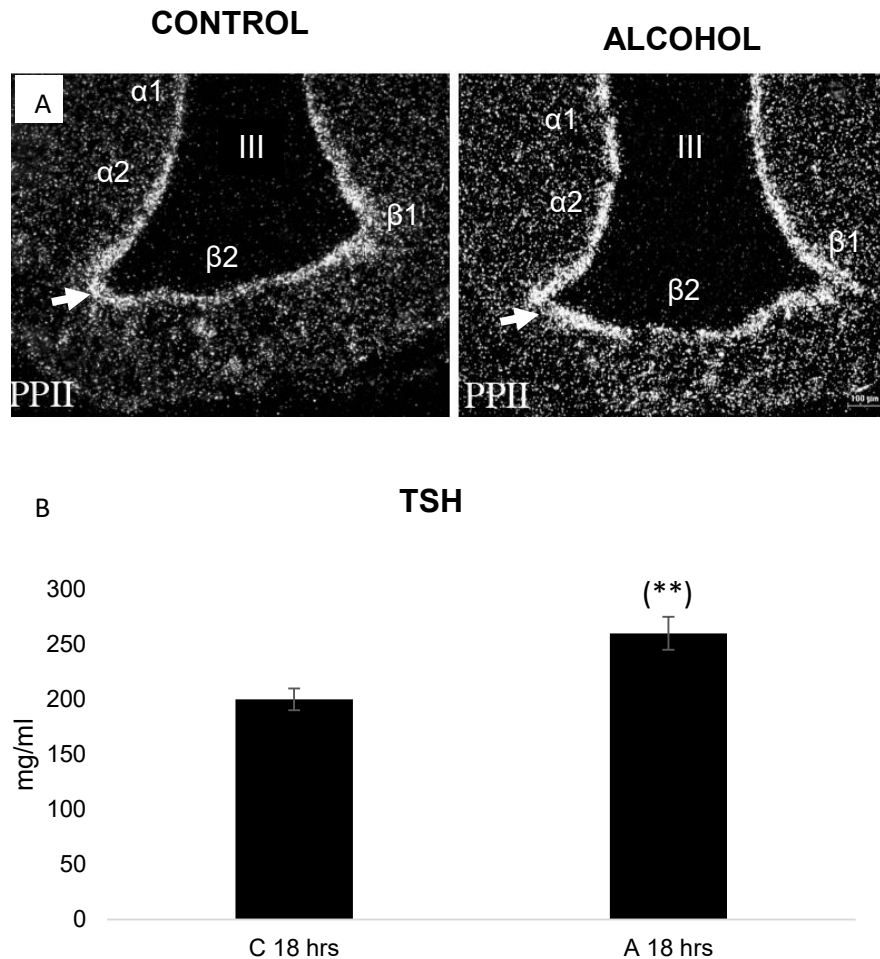


Figura 14: Efecto de una administración aguda de alcohol sobre TSH y la expresión de PPII. A) Utilizando la técnica de hibridación *in situ* se puede observar un aumento de la expresión de PPII en los tanicitos localizados en el piso del tercer ventrículo (flecha) posterior a una administración aguda de alcohol (18 horas). **B)** Aumento en los niveles de séricos de TSH tras una administración aguda de alcohol detectados por RIA. Las barras representan los valores séricos de la hormona (ng/ml) \pm el error estándar, (n = 4/grupo) (**). Representa una diferencia significativa por Bonferroni y prueba t, entre el grupo experimental y el grupo control a las 18 horas, $\alpha \leq 0.01$ (datos no publicados, Lab. Neuroend. Mol, INPRFM).

Los estudios descritos sugieren la participación de PPII en la regulación del eje tiroideo debido a una administración aguda de alcohol al incrementar su síntesis, sin embargo, es importante evaluar si la enzima es activa. Clarificar este mecanismo de inactivación como un mecanismo de plasticidad cerebral, no sólo es de interés en ciencia básica, sino que podría permitir eventualmente el desarrollo de fármacos capaces de inhibirlo (Pascual, 2005).

3.2. Variables

Variable independiente: Administración de una dosis aguda de alcohol Ip.

Variable dependiente: Niveles de ARNm y actividad específica de la PPII en la EM.

3.3. Objetivos:

3.3.1. Objetivo general:

Determinar el efecto de una administración aguda de alcohol sobre la regulación de la biosíntesis y actividad de la piroglutamil peptidasa II en los tanicitos de la eminencia media del hipotálamo.

3.3.2. Objetivos específicos:

Determinar los niveles del ARNm de PPII de los tanicitos en la EM bajo una condición aguda de alcohol.

Evaluar la actividad específica de PPII de los tanicitos localizados en la EM después de una dosis aguda de alcohol.

Analizar la actividad específica de PPII en dos regiones extra del hipotálamo: el área preóptica (Apo) y núcleo dorsomedial (NDM) después de una dosis aguda de alcohol, para determinar si el cambio observado en la actividad específica de PPII es distintivo de la EM.

Determinar los niveles del ARNm de TRH en el NPV en respuesta a una condición aguda e alcohol.

Evaluar los niveles de ARNm y actividad específica de PPII en la AP después de una administración aguda de alcohol.

3.4. Hipótesis general.

De acuerdo con los resultados preliminares se propone que la administración aguda de alcohol incrementará la biosíntesis y actividad de PPII presente en los tanicitos de la EM, contribuyendo así al ajuste central del eje tiroideo al degradar al TRH liberado antes de llegar a sus células blanco en la AP.

3.4.1. Hipótesis específicas.

Una dosis aguda de alcohol puede modular la síntesis de PPII en los tanicitos de la EM.

La actividad específica de la enzima PPII en la EM puede verse afectada por una dosis aguda de alcohol.

El cambio en la actividad específica de PPII es distintivo de la EM y no se observa en el Apo ni en el NDM después de una dosis aguda de alcohol.

Una dosis aguda de alcohol puede modular los niveles del ARNm de la hormona TRH en el NPV.

Los niveles de ARNm y actividad específica de PPII en la AP pueden verse afectados después de una administración aguda de alcohol

CAPÍTULO IV. MÉTODO

4.1. Animales.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (250-300g), proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”. Se mantuvieron de 3 a 4 animales dentro de cajas de policarbonato en condiciones controladas de luz-oscuridad (ciclo de 7:00 a 19:00 horas), a una temperatura promedio de 25°C, con acceso a comida y agua *ad libitum*. Proyecto NC093710.0, previamente aprobado por el Comité de Ética del INPRFM y el Conacyt 107109.

4.2. Material.

Todo el material de vidrio que se empleó para la preparación y almacenamiento de las soluciones se horneó a 180 °C durante 12 horas. El material de plástico, sensible a altas temperaturas se esterilizó en autoclave a 120 lb de presión durante 20 minutos. El agua que se empleó para preparar las soluciones fue desionizada (milliQ Plus, calidad: 18MΩ/cm), tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% y esterilizada a 120 lb de presión durante 30 minutos.

4.3. Diseño experimental y tipo de estudio.

El presente trabajo fue un estudio transversal con un diseño experimental de grupos independientes.

4.4. Procedimiento experimental.

Las fases que siguió el desarrollo experimental de este estudio se resumen en el diagrama de la figura 15. Posteriormente se describen cada una de estas fases.

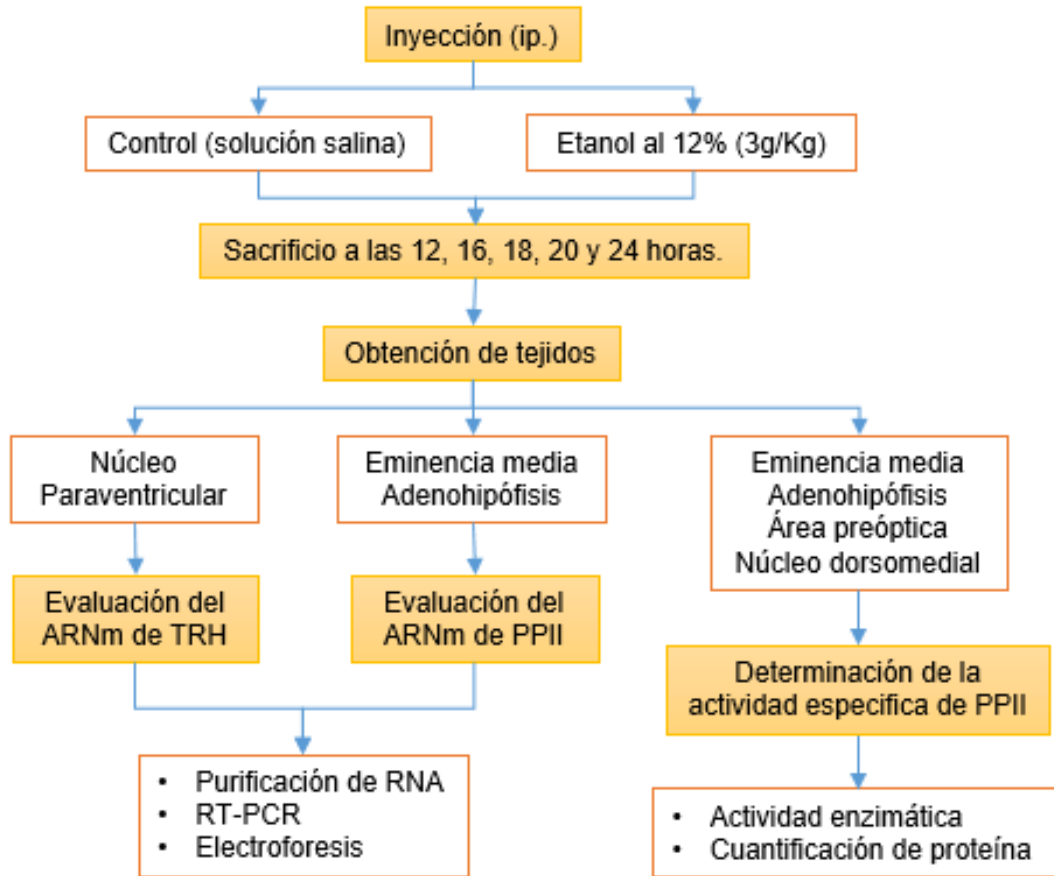


Figura 15. Fases para el desarrollo experimental.

4.4.1. Inyección de etanol.

Con la finalidad de reducir el estrés causado por el manejo de los animales el día del experimento, estos fueron manipulados durante 20 minutos/día, todos los días una semana antes del tratamiento. La variabilidad hormonal debida a los ritmos circadianos que pudiera presentarse si el experimento se iniciaba a la misma hora del día para todos los grupos experimentales, se controló inyectando a los animales en diferentes horas del día, entre las 9 y las 18 horas y sacrificándolos todos entre las 9 y 11 de la mañana.

El procedimiento experimental consistió en administrar al grupo problema una inyección intraperitoneal (ip) de 4.5 ml de etanol disuelto al 20% en solución salina al 0.9% (PISA); el volumen de 4.5 ml disminuye la irritación que pudiera ser causada por el etanol si este se administrara sólo. Considerando que para inducir una narcosis en el animal, así como cambios en la actividad y expresión de la enzima de interés, se requieren 3 g de etanol por kilogramo de masa corporal, se utilizó la dosis aplicada por de Gortari y colaboradores (2000). Los animales del grupo control fueron inyectados con un volumen equivalente de solución salina. Ambos grupos fueron inyectados 12, 16, 18, 20, 22 y 24 horas previas al sacrificio.

La aplicación de las inyecciones ip. en ambos grupos se realizó a una velocidad aproximada de 8 ml por minuto. Para evitar que la diferencia de tiempo afectara a las ratas de los distintos grupos, las pruebas se hicieron alternando un animal del grupo control y un experimental. Al final de las inyecciones se evaluó que las ratas inyectadas con alcohol perdieran la capacidad de mantenerse sobre sus cuatro patas como muestra de que la sedación fue efectiva (figura 16). Ninguna de los animales control presentó sedación.



Figura 16: Administración de una dosis aguda de alcohol. Inyección intraperitoneal de alcohol (izquierda). Sedación de los animales experimentales hasta quedarse dormidos (derecha).

4.4.2. Extracción del tejido y preparación de las muestras.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron sus cerebros y AP cuidando la preservación de la EM al cortar el nervio óptico del cráneo. El tejido se congeló rápidamente en hielo seco y se almacenó a -70°C cubriéndolos con parafilm y papel aluminio hasta su procesamiento. La disección del tejido cerebral se hizo con un criostato a partir de cortes rostro-caudales de 20 micras de grosor hasta llegar a la región (placa 23 P900 μm en el Atlas de Palkovits y Brownstein, 1988). Las muestras se almacenaron nuevamente a -70°C para su posterior procesamiento.

Para obtener muestras de las regiones de interés, se colocó a cada cerebro congelado con la vista dorsal hacia abajo, entre pastillas de hielo seco para descongelarlo durante un minuto aproximadamente. Con una navaja de un sólo filo se realizó un corte transversal de 1mm aproximadamente y luego un segundo corte posterior al primero del mismo grosor. Este procedimiento se realizó sobre una caja Petri con hielo seco pulverizado dentro de ella para mantener la temperatura de la muestra. De la primer rebanada se disectó el NPV del hipotálamo y el Apo mediante un sacabocados de 1 mm² de diámetro interno y de la segunda rebanada se obtuvo la EM y el NDM del hipotálamo con un sacabocados del mismo diámetro interno (Ver figura 17). En todo momento se trabajó cerca del hielo seco para evitar que el tejido se descongelara por completo y se degradara el ARN; al terminar las muestras se volvieron a almacenar a -70°C .

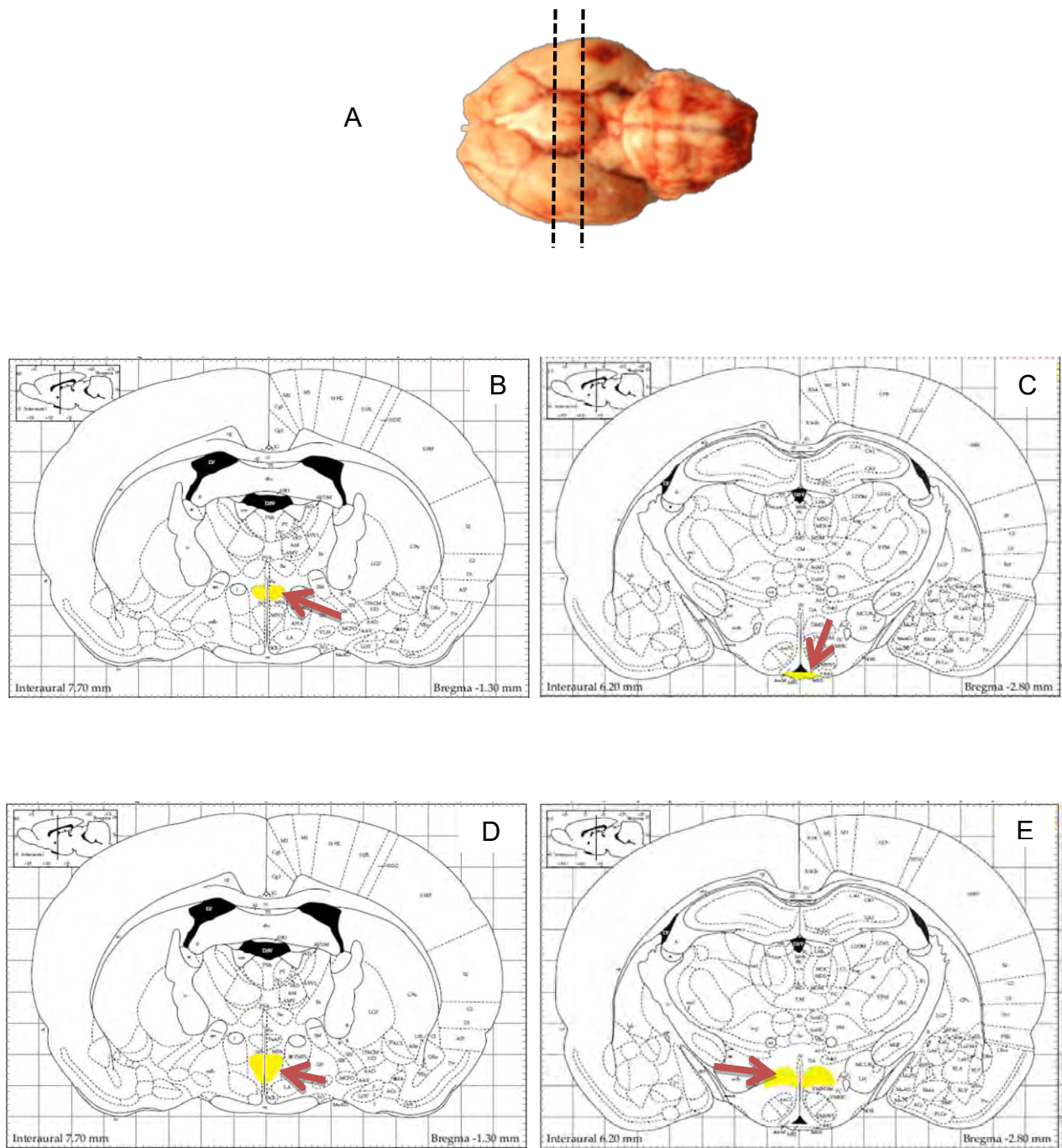


Figura 17. Ubicación de las áreas hipotálamicas disecadas en cerebro de rata. A) Sección en donde se realizaron los cortes coronales. B) Localización del núcleo paraventricular del hipotálamo. C) Localización de la eminencia media. D) Localización del área preóptica. E) Localización del núcleo dorsomedial del hipotálamo. Tomado y modificado de Palkovits y Brownstein (1988).

4.4.3. Cinética del alcohol sobre ARNm de la piroglutamil peptidasa II

La extracción de ARN total se realizó siguiendo el protocolo de Chomczynski y Sacchi (2006), cuidando el tiempo de procesamiento, la temperatura y un espacio libre de ARNasas para evitar la degradación de ARN del tejido. Se corroboró la integridad del ARN purificado de cada región por electroforesis. El ARNm purificado fue transcrito a ADNc por transcripción reversa (RT) y amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Previo a la realización de la PCR para los genes en cuestión, se realizó una estandarización del número de ciclos óptimos para su cuantificación en cada región cerebral. Se amplificaron los genes de TRH, PPII, ciclofilina y ribosomal (18s); siendo considerados TRH y PPII los genes experimentales a partir de los cuales se evaluó la regulación de PPII bajo una administración aguda de alcohol. Los genes de ciclofilina y ribosomal se emplearon como genes constitutivos y controles internos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%, suspendidos en 700 ml de buffer Tris Borato EDTA durante 1 hora a 120 voltios. Se tiñeron los geles en una solución de bromuro de etidio -agua Milli Q durante 5 minutos. Finalmente con ayuda del transiluminador se obtuvo la imagen del gel para la cuantificación de las bandas (figura 18). Los protocolos completos de este procedimiento se encuentran descritos en los anexos 1,2 y 3.



Figura 18. Gel en soporte de agarosa. Imagen digital de un gel teñido con bromuro de etidio y revelado con rayos UV. Las bandas señalan la expresión del gen a evaluar.

4.4.4. Análisis semicuantitativo de la señal densitométrica en soportes de agarosa.

Se adquirió una imagen digital de los geles con una cámara digital y se convirtió mediante el programa Photoshop a escala de grises para proseguir con su cuantificación en el programa Image J, en donde se cuantificó la densidad óptica de las bandas de los mensajeros experimentales y control. Con el fin de aminorar el ruido de fondo y de esta manera obtener un análisis semicuantitativo más confiable se obtuvo el cociente de la densidad óptica de los genes experimentales entre los genes controles como se observa en la siguiente fórmula.

Fórmula para obtener el valor arbitrario de la densidad óptica total

$$d_T = d_{O_E} / d_{O_C}$$

Dónde:

d_T = Densidad total

d_{O_E} = Densidad óptica bandas de genes experimentales

d_{O_C} = Densidad óptica bandas gen control

4. 4. 5. Determinación de la actividad específica de PPII.

Para calcular la actividad específica de PPII: actividad de la enzima por minuto por microgramo de proteína ($\mu\text{mol } \beta\text{NA}/\text{min} \cdot \mu\text{g}$ proteína), primero se determinó la actividad enzimática de PPII siguiendo el protocolo descrito por Kelly et. al. (1999). Este procedimiento se basa en un ensayo enzimático acoplado a un fluoróforo (βNA), utilizando TRH- βNA , ($\text{pGlu-His-Pro}\beta\text{NA}$) como sustrato de PPII. El producto de esta primer reacción ($\text{His-Pro}\beta\text{NA}$) es hidrolizado por la enzima dipeptidil aminopeptidasa IV, dejando al fluoróforo libre. Posteriormente se cuantificó la cantidad de producto hidrolizado ($\mu\text{mol } \beta\text{NA}$) mediante un espectrofluorómetro. Al final se realizó la cuantificación total de proteína presente de las regiones en cuestión, siguiendo el método descrito por Bradford (1976). El protocolo completo se encuentra en el anexo 4.

4.4.6. Análisis estadístico.

Los datos cuantitativos son resumidos en forma de la media \pm el valor del error estándar. Se determinó la significancia estadística mediante un análisis de varianza (ANOVA de una vía, no-paramétrica). Cuando se compararon las diferencias entre los promedios de dos grupos (experimentales y controles en los diferentes horarios de análisis), se empleó la prueba “*t*” de student. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$ y $P < 0.01$. Ambos análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prisma (Ver tabla 3).

Tabla 3. Diseño del análisis estadístico

HORARIO/ EVALUACIÓN	12 horas	16 horas	18 horas	20 horas	24 horas
MENSAJERO	No se determinó	Control	No se	Control	Control
		Etanol	Determinó	Etanol	Etanol
ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	Control	Control	Control	Control	Control
	Etanol	Etanol	Etanol	Etanol	Etanol

Evaluaciones que se realizaron del mensajero y actividad enzimática a los animales control y experimental a las 12, 16, 18, 20 y 24 horas.

CAPÍTULO V. RESULTADOS.

5.1. ARNm total obtenido a partir de animales experimentales y control.

Los valores ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de ARN extraído, se obtuvieron a partir de la cuantificación de la absorbancia del ARN en un espectrofotómetro; posteriormente se determinó la cantidad de ARN total (μg) extraída por región. En la tabla 4 se muestra que la extracción de ARN fue exitosa y significativa en todas las regiones (μg obtenidos por región); la relación 260/280 muestra la pureza del ARN extraído con respecto a la cantidad de proteínas presentes en la muestra (valor igual o mayor a 1.5 = pureza alta).

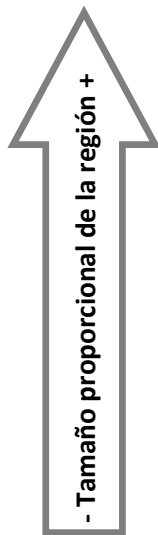


Tabla 4. Cantidad de RNA total (μg) obtenidos por región.

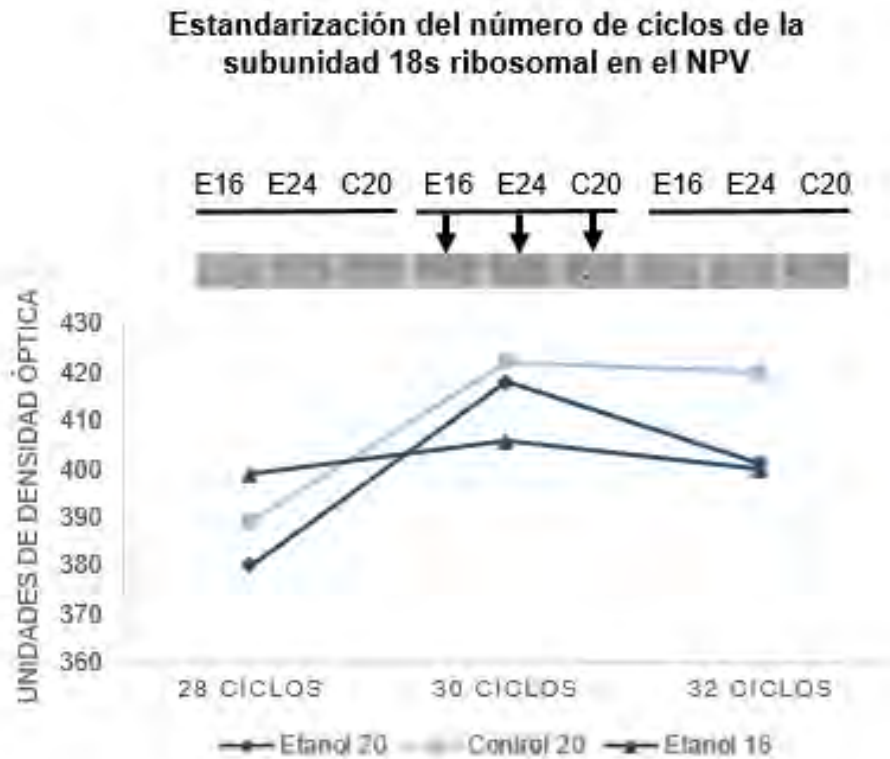
Región cerebral	Promedio	Desv. st \pm esm	Relación 260/280	Desv. St \pm esm
Adenohipófisis	1.185	0.358 \pm 0.071	1.69	0.083 \pm 0.017
Núcleo paraventricular del hipotálamo	0.227	0.12 \pm 0.29	1.60	0.108 \pm 0.024
Eminencia Media	0.419	0.187 \pm 0.043	1.59	0.054 \pm 0.021

Se describe la media y la relación 260/280 \pm error estándar. La flecha señala la dirección en que va aumentando el tamaño de la muestra.

5.2. Estandarización del número de ciclos para la amplificación de genes problema y control por RT-PCR

En la gráfica 1 se puede observar los niveles de amplificación de la subunidad 18 S del ARN ribosomal de dos muestras experimentales y un control en el NPV. Se determinó como punto óptimo de la amplificación del ADNc de este gen 30 ciclos, ya que

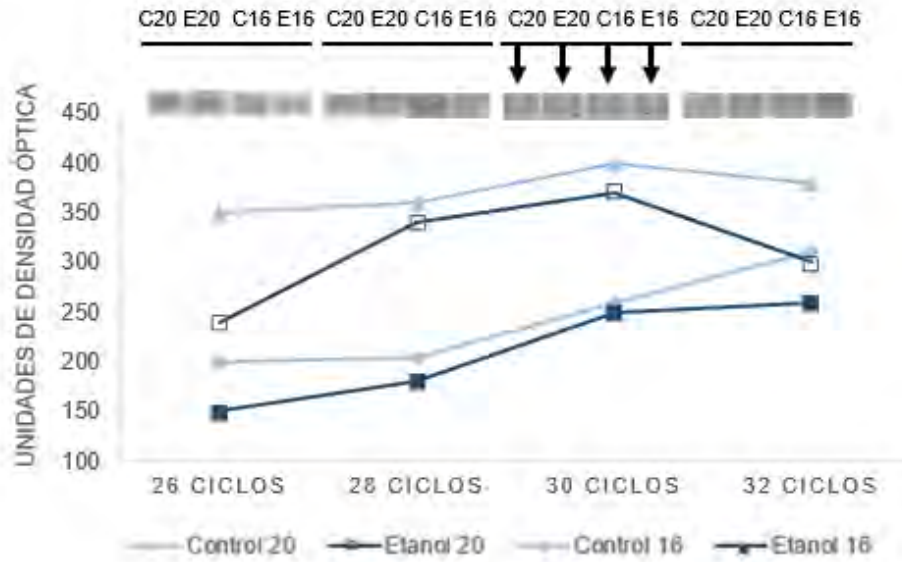
no se observa saturación de la muestra, es decir que la pendiente sigue creciendo, contrario a lo que se observa a los 32 ciclos donde la curva indica que el gen dejó de amplificarse.



Gráfica 1. Estandarización del número de ciclos de la subunidad 18s ribosomal en el NPV. En el eje de las abscisas se representa el número de ciclos a los que corrió la PCR y el eje de las ordenadas simboliza los niveles de densidad óptica cuantificados en cada muestra. Las pendientes representan la cantidad de ADNc amplificado a los 28, 30 y 32 ciclos de dos muestras experimentales y un control. Las bandas del gel revelan al gen amplificado a los 28, 30 y 32 ciclos de las muestras etanol 16 horas (E16), etanol 24 horas (E24) y control 20 horas (C20). La flecha representa el punto óptimo de amplificación.

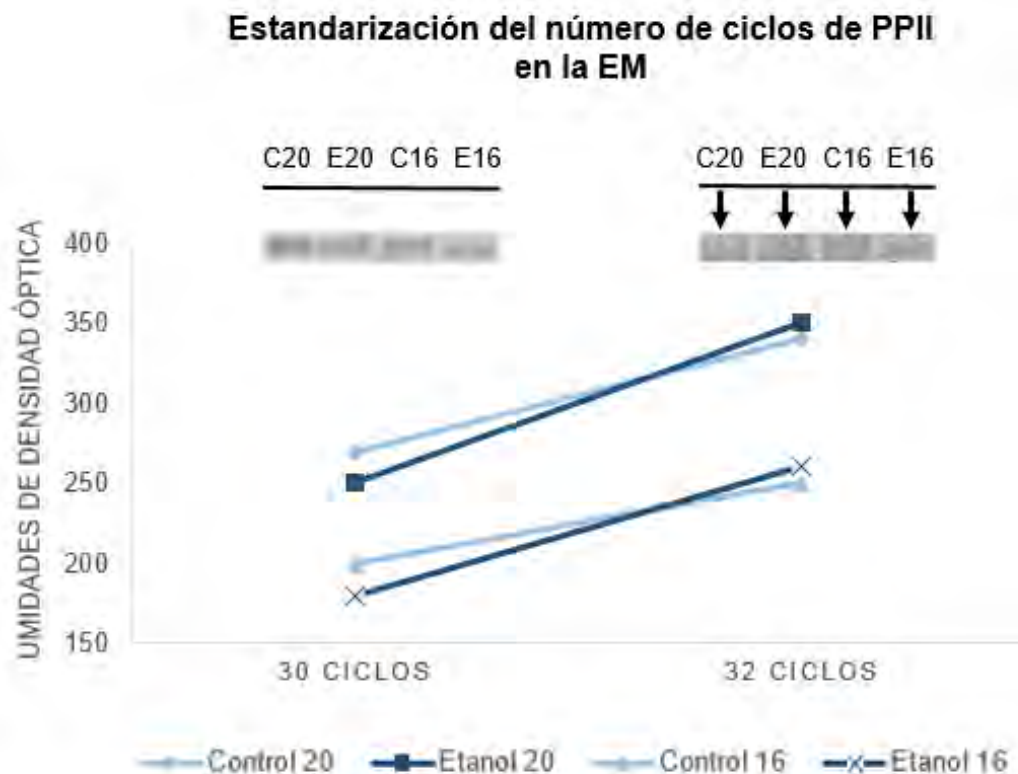
En la EM se realizó una estandarización de los ciclos para la reacción en cadena de la polimerasa, en dos muestras experimentales y dos muestras control para el gen constitutivo subunidad 18 S ribosomal. Se eligieron los 30 ciclos como punto óptimo para la realización de la PCR del gen constitutivo en la EM, ya que el producto se sigue amplificando (ver gráfica 2).

Estandarización del número de ciclos de la subunidad 18s ribosomal en el EM



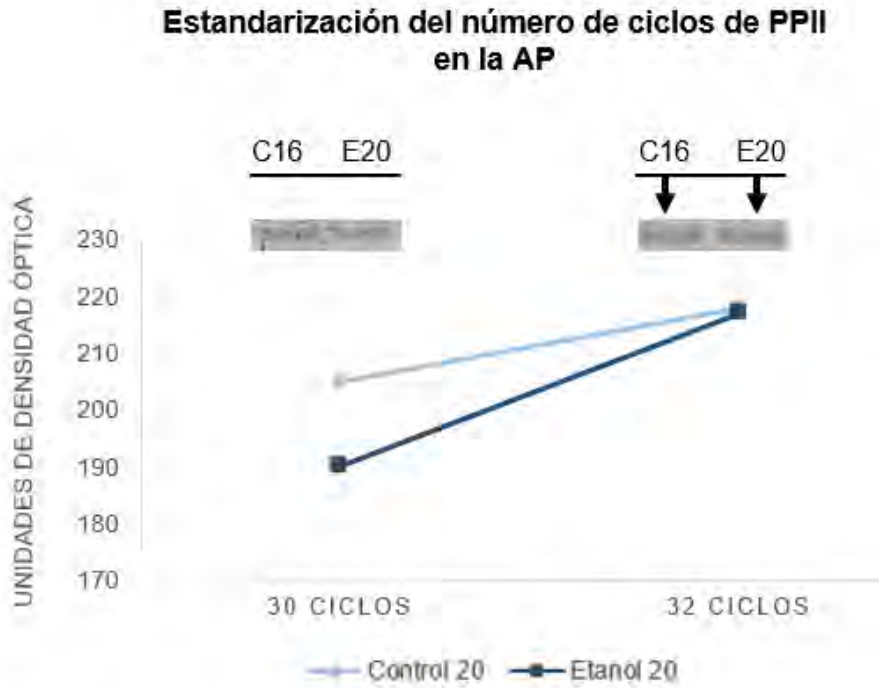
Gráfica 2. Estandarización del número de ciclos de la subunidad 18 S ribosomal en la EM. En el eje de las abscisas se representa el número de ciclos a los que corrió la PCR y el eje de las ordenadas simboliza los niveles de densidad óptica cuantificados en cada muestra. Las pendientes representan la cantidad de ADNc amplificado a los 28, 30 y 32 ciclos de dos muestras experimentales y dos controles. Las bandas revelan al gen amplificado a los 26, 28, 30 y 32 ciclos de las muestras control 20 horas (C20), etanol 20 horas (E20), control 16 horas (E16) y etanol 16 horas (E16). Las flechas representan el punto óptimo de amplificación.

Se realizó una estandarización para la amplificación por PCR de PPII en la EM con dos muestras experimentales y dos muestras control. En la gráfica 3 se puede observar que el punto óptimo para la amplificación del gen de PPII fueron los 32 ciclos en la EM, debido a que las pendientes, visibles en la gráfica 3 siguen creciendo como señal de que se sigue amplificando el gen.



Gráfica 3. Estandarización del número de ciclos de PPII en la EM. En el eje de las abscisas se representa el número de ciclos a los que corrió la PCR y el eje de las ordenadas simboliza los niveles de densidad óptica cuantificados en cada muestra. Las pendientes representan la cantidad de ADNc aplicado a los 30 y 32 ciclos de dos muestras experimentales y dos controles. Las bandas revelan al gen amplificado a los 30 y 32 ciclos de las muestras control 20 horas (C20), etanol 20 horas (E20), control 16 horas (C16) y etanol 16 horas (E16). Las flechas representan el punto óptimo de amplificación.

La última estandarización de ciclos de amplificación para PCR que se realizó, fue la del gen de PPII en la AP de una muestra experimental y una muestra control. Se puede observar en la gráfica 4 que los valores de amplificación siguen creciendo a los 32 ciclos, por lo que se determinó este punto como óptimo para la realización de la PCR.



Gráfica 4. Estandarización del número de ciclos de PPII en la AP. En el eje de las abscisas se representa el número de ciclos a los que corrió la PCR y el eje de las ordenadas simboliza los niveles de densidad óptica cuantificados en cada muestra. Las pendientes representan la cantidad de ADNc amplificado a los 30 y 32 ciclos de una muestra experimental (E20) y un control (C20). Las bandas revelan al gen amplificado a los 30 y 32 ciclos de las muestras control 16 horas y etanol 20 horas. Las flechas representan el punto óptimo de amplificación.

5.3. Análisis de la señal del ARNm de PPII y TRH, por RT-PCR en ratas expuestas a una dosis aguda de alcohol.

Se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía entre la expresión de PPII y ciclofilina en la EM. No se encontró diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales y control en los diferentes tiempos posteriores a la inyección ($F = (5/13) 2.133$; $p = ns$). A pesar de ello, se determinó un aumento significativo en la expresión de PPII de animales experimentales respecto al grupo control a las 20 horas ($t = 8.84 (2)$; $p \leq 0.05$) (No se muestran los datos).

Por su parte, al amplificar el gen de PPII y calcular el cociente con la subunidad ribosomal 18 S en la EM, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($F(5/13) = 7.94$ $p \leq 0.01$) en los niveles de ARNm de PPII entre los diferentes grupos de animales inyectados con una dosis aguda de alcohol y un vehículo de solución salina (ver tabla 5).

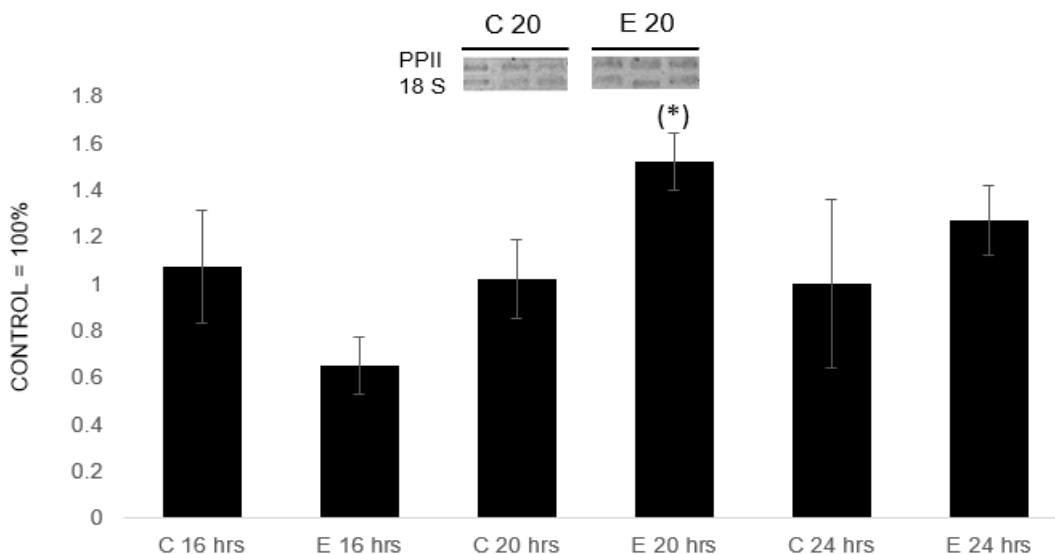
Tabla 5. Niveles de expresión de PPII y TRH debido a una administración aguda de alcohol.

Expresión/Grupo experimental	16 horas		20 horas		24 horas	
	Control	Etanol	Control	Etanol	Control	Etanol
ARNm PPII en EM	1.07 ± 0.24 (3)	0.65 ± 0.12 (3)	1.02 ± 0.17 (3)	1.52 ± 0.12 (3)^(*)	1 ± 0.36 (3)	1.27 ± 0.15 (3)
ARNm de PPII en AH	0.95 ± 0.30 (3)	1.5 ± 0.23 (4)^(*)	1 ± 0.32 (3)	0.68 ± 0.30 (3)	1.02 ± 0.22 (3)	0.83 ± 0.21 (3)
ARNm de TRH en NPV	0.99 ± 0.09 (4)	1.03 ± 0.03 (4)	0.99 ± 0.05 (4)	1.39 ± 0.07 (4)^(*)	1.03 ± 0.12 (4)	1.08 ± 0. (4)

Valores del mensajero de PPII y TRH en hipotálamo y AP después de una dosis aguda de alcohol. Se representa la media ± la desviación estándar de (n) animales/grupo. (*) Representa una diferencia significativa por Bonferroni y prueba de "t", entre el grupo experimental y el grupo control al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.05$.

En la siguiente figura (19) se puede observar la amplificación el gen de PPII y la subunidad ribosomal 18 s en la EM de cada muestra problema y control. Se encontró un aumento en la expresión del mensajero de PPII en los animales inyectados con etanol respecto al grupo control a las 20 horas ($t = 20.71$ (2); $p \leq 0.01$). La diferencia en el ARNm entre los grupos control y experimental no es significativa a las 16 horas ni a las 24 horas.

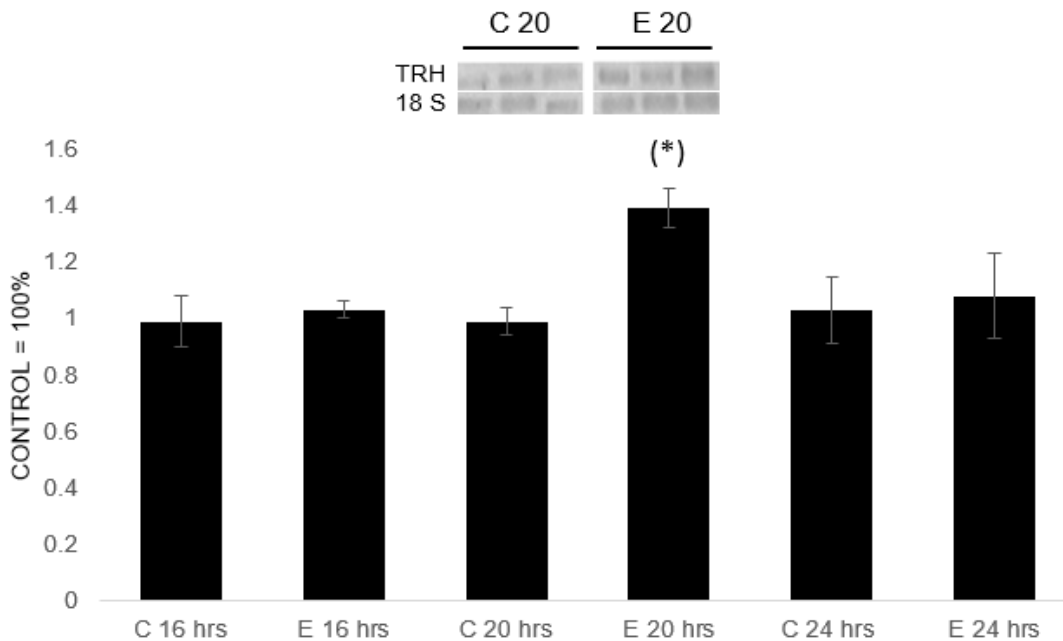
Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre los niveles de ARNm de PPII en la EM



Gráfica 5. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre los niveles de ARNm de PPII en la EM. Los símbolos representan la media \pm el error estándar ($n = 3/\text{grupo}$). (*) Representa una diferencia significativa por Bonferroni y prueba de “t”, entre el grupo experimental y el grupo control al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.05$. En la parte superior se observa el gel de PCR para PPII y la subunidad 18 S ribosomal en la EM, con muestras control y experimental a las 20 horas.

Se determinó también la expresión del gen que codifica para TRH en el NPV. No se encontró una diferencia significativa en la expresión de TRH entre los grupos de animales experimentales y control en los tiempos analizados mediante un ANOVA ($F = (5/11) 2.246$ $p \leq 0.05$). Sin embargo, aplicando un análisis particular se halló una diferencia estadísticamente significativa en el grupo de 20 horas cuando se aplica el análisis de prueba de “t” para ese grupo respecto a su control ($t = 5.696$ (3) $p \leq 0.01$) (Ver grafica 6).

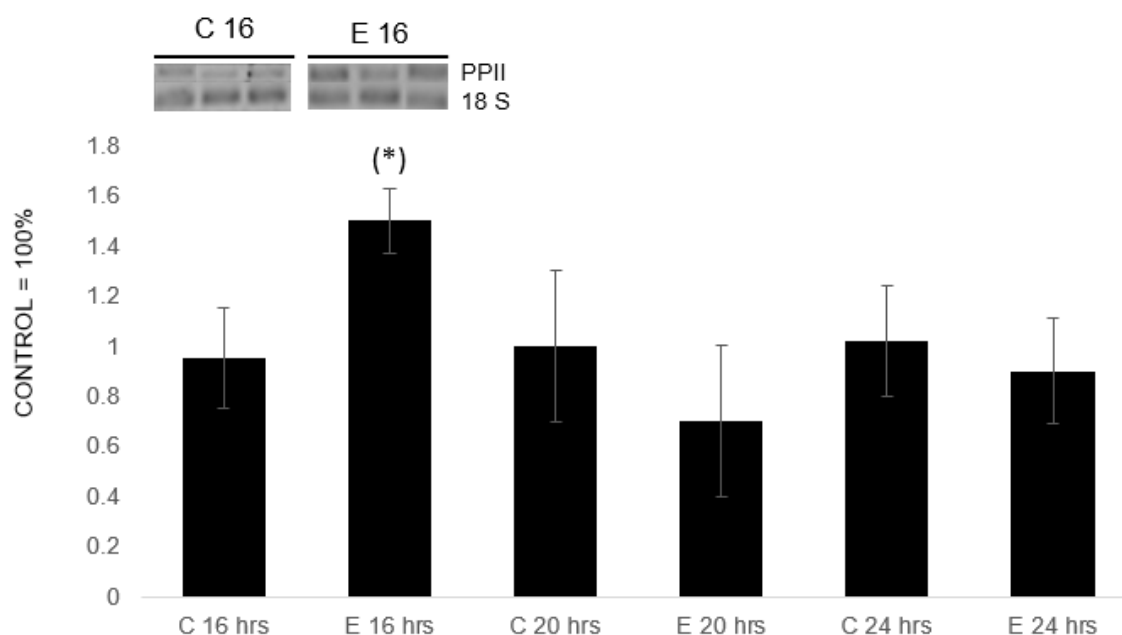
Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre los niveles de ARNm de TRH en el NPV



Gráfica 6. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre los niveles de ARNm de TRH en el NPV. Las barras representan la media \pm el error estándar (n =3 /grupo). (*) Representa una diferencia significativa por prueba "t", entre el grupo experimental y el grupo control al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.05$. En la parte superior se observa el gel de PCR para TRH y la subunidad 18 S ribosomal en el NPV, con muestras control y experimental a las 20horas.

En la AP se determinó una diferencia estadísticamente significativa en los niveles de expresión de PPII, entre los animales a los que se les inyectó una dosis aguda de alcohol y los del grupo control en los diferentes tiempos de análisis (ANOVA; $F = (5/18) 11.31$ $p \leq 0.01$). En la gráfica 7 se observan los niveles de ARNm de PPII en animales experimentales significativamente mayores a los del grupo control a las 16 horas ($t = 5.079$ (6), $p \leq 0.01$).

Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre los niveles de ARNm de PPII en la AP

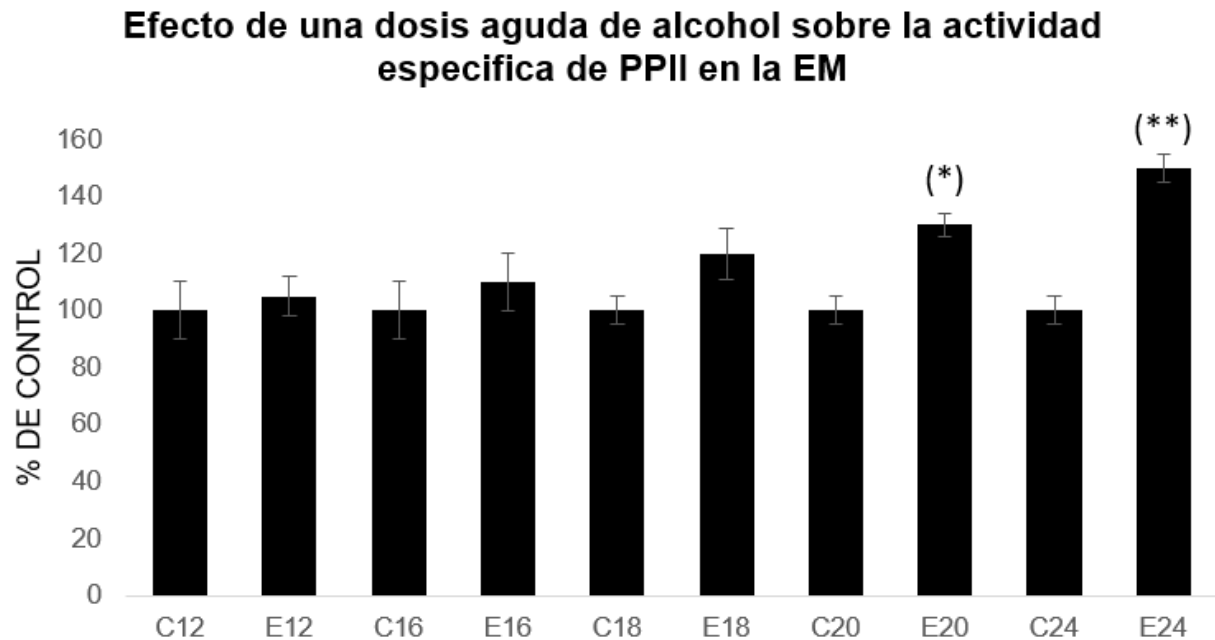


Gráfica 7. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre los niveles de ARNm de PPII en la AP. Los símbolos representan la media \pm el error estándar ($n = 4/\text{grupo}$). (*) Representa una diferencia significativa por Bonferroni y prueba de t, entre el grupo experimental y el grupo control al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.05$. En la parte superior se observa el gen amplificado PPII y la subunidad 18 S ribosomal de las muestras control y experimental a las 16 horas.

5.4. Análisis de la actividad específica de PPII en ratas expuestas a una dosis aguda de alcohol

La segunda evaluación que se realizó en el presente estudio fue la cuantificación de la actividad específica de PPII sobre el péptido liberado (TRH) en la EM, después de una administración aguda de alcohol. Se determinó mediante un ANOVA de una vía, que la desigualdad entre los grupos experimentales y control en sus diferentes tiempos de análisis es estadísticamente significativa ($F = (9/53) 5.05$ $p \leq 0.01$). En la gráfica 8 se puede observar que los niveles de actividad específica de PPII en la EM de animales

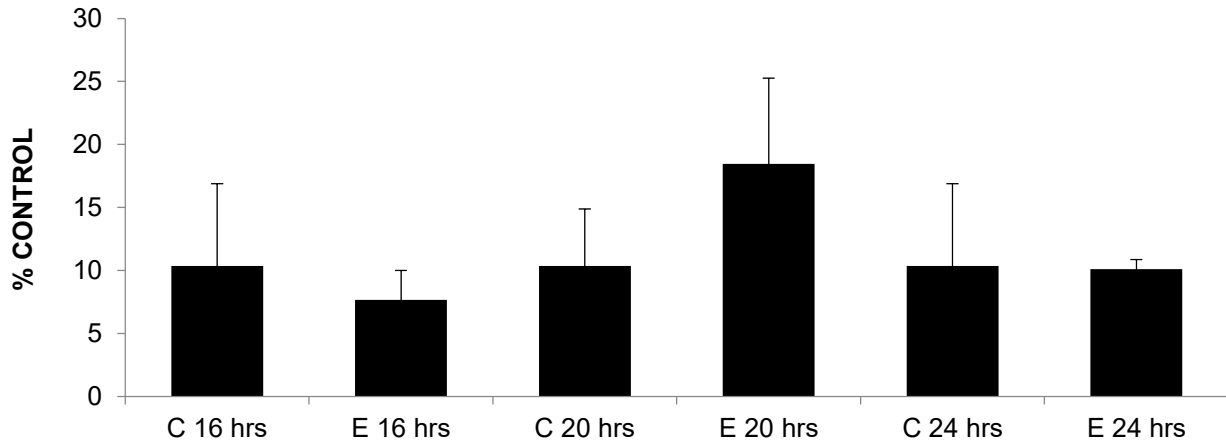
inyectados con una dosis aguda de alcohol, fueron significativamente mayores respecto a animales control pareados e inyectados con un vehículo de solución salina, tanto a las 20 horas ($t = 4.713 (12)$, $p \leq 0.05$) como a las 24 horas ($t = 4.295 (19)$, $p \leq 0.01$).



Gráfica 8. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre la actividad específica de PPII en la EM. Los barras representan la media \pm el error estándar ($n = 4, 7$ o 11 /grupo). Diferencia significativa por Bonferroni y prueba “ t ”, entre el grupo experimental y el grupo control al mismo tiempo (**) $\alpha \leq 0.01$ y (*) $\alpha \leq 0.05$.

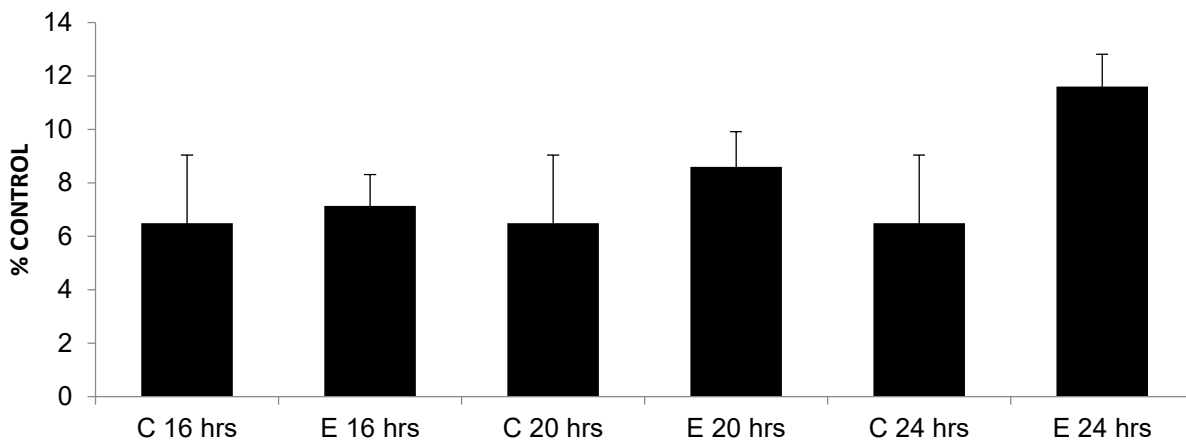
Para corroborar la especificidad de la respuesta, se realizó el ensayo enzimático y la cuantificación de proteína en otras dos regiones hipotalámicas: el núcleo dorsomedial y el área preóptica. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los animales control y los experimentales a las 16, 20 ó 24 horas. Se observó una tendencia de aumento en la actividad específica a las 20 horas en el núcleo dorsomedial y a las 24 horas en el área preóptica, sin embargo no fueron estadísticamente significativos (ver gráficas 9 y 10).

Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre la actividad específica de PPII en el NDM



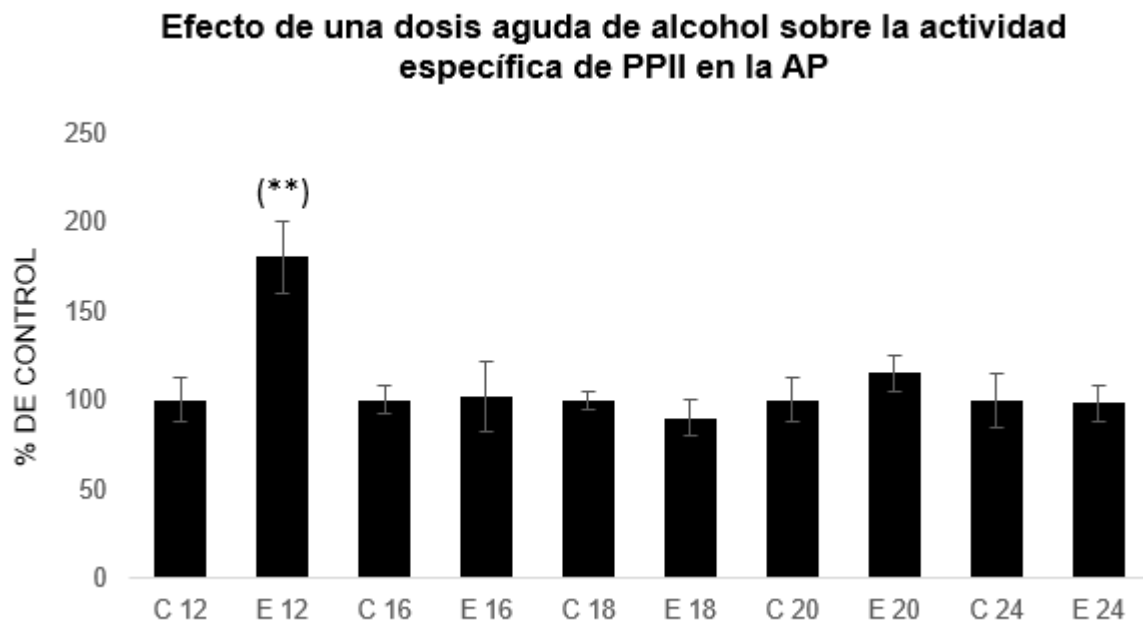
Gráfica 9. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre la actividad específica de PPII en el núcleo dorsomedial. Las barras representan la media \pm el error estándar ($n = 4/\text{grupo}$). (Ns). Representa una diferencia no significativa por Bonferroni y prueba "t", entre los grupos control y experimental al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.05$.

Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre la actividad específica de PPII en el Apo



Gráfica 10. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre la actividad específica de PPII en el área preóptica. Las barras representan la media \pm el error estándar ($n = 4/\text{grupo}$). (Ns). Representa una diferencia no significativa por Bonferroni y prueba "t", entre los grupos control y experimental al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.05$.

Por último se cuantifico la actividad específica de PPII en la AP y se encontró una diferencia significativa entre los grupos control y experimental en los diferentes horarios (ANOVA; $F = (9/28) 2.464$ $p \leq 0.01$). Los valores de actividad específica de PPII de animales inyectados con una dosis aguda de alcohol fueron mayores a los valores de animales control a las 12 horas ($t = 6.566$ (4), $p \leq 0.01$) (Ver gráfica 11).



Gráfica 11. Efecto de una dosis aguda de alcohol sobre la actividad enzimática de PPII en la AP. Las barras representan la media \pm error estándar ($n = 4$ o 7 /grupo). (**) Representa una diferencia significativa por Bonferroni y prueba t, entre el grupo experimental y el grupo control al mismo tiempo, $\alpha \leq 0.01$.

En este lugar, del tamaño de una uña, vive la verdadera existencia primitiva (Vegetativa, Emocional, Reproductiva) sobre la cual, con mayor o menor éxito, el Hombre ha sobre impuesto una Corteza de inhibiciones”.

H. CUSHING (1929)

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN.

El consumo inmoderado de alcohol es una problemática mundial asociada a 3.3 millones de muertes anuales y un factor causal en más de 200 enfermedades y trastornos que deterioran la salud física, mental y social del paciente, e incluso de los familiares (ONU, 2015). En consecuencia, entender los mecanismos cerebrales que están involucrados en su consumo, preferencia y refuerzo; permitirá el desarrollo de fármacos que ayuden a disminuir o eliminar los efectos nocivos del alcohol. Sin embargo, las propiedades que posee esta molécula (bajo peso molecular, antipática, etc.) (Elvir, 1993), así como su alta afinidad en distintas poblaciones neuronales, conllevan mecanismos tan complejos como la misma organización del SN.

En la larga lista de neurotransmisores y neuromoduladores afectados por el consumo agudo y crónico de alcohol, aparece TRH, un tripéptido (pGlu-His-ProNH_2) sintetizado en las células parvocelulares del NPV del hipotálamo, responsable de la regulación del eje tiroideo mediante su liberación al sistema portal hipofisario. El eje HHT es un elemento importante del sistema neuroendocrino y participa en la homeostasis energética de los organismos, por lo tanto, su adecuada regulación por las células TRHérgicas debe asegurar un balance entre el catabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas obtenidos de la dieta y el insumo energético para cubrir funciones vitales e incluso condiciones extremas que implican un estrés físico o psicológico (Joseph-Bravo, Jaimes, Uribe y Charli, 2015).

Las primeras evidencias de alteraciones en el funcionamiento del HHT debido al consumo de alcohol, comenzaron con observaciones clínicas de hipotermia en pacientes alcohólicos, que incluso podría poner en riesgo su vida (Sanz, et. al., 2009). No obstante, se puede generar un grado de hipotermia en animales y humanos desde una administración aguda de alcohol debido a su efecto sobre el eje tiroideo, al decrementar los niveles séricos de hormonas tiroideas (Zoeller y Rudeen, 1992) y de TSH (de Gortari,

2000). A pesar de que existe más de un mecanismo de regulación de la temperatura corporal (Guyton, 2011), estas evidencias ponen de manifiesto, la importancia de la modulación del eje tiroideo para una adecuada termorregulación y ajuste metabólico bajo condiciones agudas de alcohol. Lo anterior se reafirma con la capacidad de TRH para revertir el efecto hipotérmico del alcohol (Zoeller, 1994).

Un proceso fundamental de la comunicación química en el SN y por ende, blanco para el desarrollo farmacológico, es la inactivación del neurotransmisor o neuromodulador liberado hacia su célula blanco. En el eje tiroideo, bajo otros paradigmas experimentales, Sánchez (2009) y Lazcano (2015) han concluido que la degradación del péptido TRH es un proceso regulado a nivel central. En consecuencia, el presente estudio se realizó con la finalidad de determinar si la actividad de la enzima que degrada a TRH: la piroglutamil peptidasa II, localizada en los tanicitos de la EM, es regulada en respuesta a una administración aguda de alcohol, participando así en la modulación del eje tiroideo al hidrolizar el enlace piroGlu-His del TRH liberado al sistema portal hipofisiario.

Los resultados obtenidos en la primera evaluación, tras haber estandarizado las condiciones de amplificación para PPII en la EM, mostraron que la administración aguda de alcohol incrementa los niveles de expresión de PPII 20 horas después del tratamiento. Este resultado confirma lo encontrado por de Gortari (2005) en bloques de tejido del hipotálamo que contenían la EM; y en estudios preliminares por hibridación *in situ* (datos no publicados, Lab. Neuroend. Mol, INPRFM). Por lo tanto, se corrobora que el aumento en la síntesis de novo de PPII ocurre en la EM, en respuesta a una dosis aguda de alcohol.

Los valores obtenidos por RT-PCR de punto final para PPII se compararon contra los valores de los genes constitutivos de ciclofilina y de la subunidad ribosomal 18S; en ambas condiciones se observó un aumento significativo de PPII a las 20 horas. Aunque no existe reporte sobre la modulación en la expresión de ciclofilina debido a una dosis aguda de alcohol, en el estudio se decidió no tomar este gen como constitutivo, ya que también mostró ser regulado por el tratamiento de alcohol en una dosis aguda. Dicha situación no se observó con el gen de la subunidad ribosomal 18S, debido a que el patrón de expresión se mantuvo constante.

Congruente con el aumento de la síntesis PPII en la EM, los datos obtenidos en la segunda parte de este estudio nos permiten sugerir que la enzima requiere la síntesis de novo para ser activa. Después de la inyección Ip. con una dosis aguda de alcohol se presentó un aumento en la actividad de PPII presente en los tanicitos $\beta 2$ de la EM, entre las 20 y 24 horas. Este aumento de la actividad de PPII conlleva a la degradación del péptido TRH antes de unirse a sus receptores en la AP, del mismo modo en que sucede con otras regiones del SN: amígdala cerebral, corteza frontal, hipocampo y núcleo acumbes; en donde la actividad de las neuronas TRHérgicas es regulada por una dosis aguda de alcohol pero a tiempos cortos (de Gortari, et. al., 2005). Dicha diferencia temporal puede deberse a la relación o función (emocional, cognitiva o conductual) de estas áreas responsivas en donde TRH juega un papel neuromodulador y que podrían estar involucradas en los efectos del alcohol (Gutiérrez, et. al., 2008; Rodríguez, et. al., 2014; Vargas, 2013; Nie y Liu, 1991).

De esta manera, los resultados de la expresión de ARNm y la actividad enzimática de PPII obtenidos durante la realización del presente estudio, nos permitieron corroborar la hipótesis del mismo. La administración aguda de alcohol aumenta la síntesis de novo de PPII en la EM y es sobrevenida por un aumento en su actividad. En consecuencia, se propone que la inactivación de TRH por PPII promueve la remoción del péptido del sistema portal hipofisiario, evitando la desensibilización de los receptores en la AP por exceso de ligando, dejando lista a la célula blanco para recibir una nueva señal (Charli, et. al. 1998) y así contender con los efectos perniciosos del alcohol. Por consiguiente, se puede considerar a la piroglutamil peptidasa II de los tanicitos $\beta 2$, como un mecanismo regulatorio en la liberación de TRH, que pudiera ser indispensable para mantener la homeostasis energética del organismo.

Es posible que el aumento en la actividad de PPII en la EM del presente estudio, no resulte tan alta en comparación con los resultados encontrados previamente por de Gortari (2005), sin embargo, esta discrepancia pudiera deberse a diferencias relacionadas con la adquisición de las muestras entre ambos estudios. De Gortari y colaboradores (2005) emplearon muestras de tejido de un diámetro y posiblemente también profundidad, mayores a los empleados en este estudio; disectaron manualmente

el hipotálamo en su totalidad a partir de una rebanada de un corte coronal cuyo grosor depende de la experiencia del investigador. La expresión del ARNm de PPII en el hipotálamo si bien es alta en los tanicitos de la EM, también se ha localizado en núcleos hipotalámicos aledaños (Heuer, Ehrchen, Bauer y Shafer, 1998). Este hecho nos permitió considerar la posibilidad de un aumento adicional de la actividad de PPII en respuesta a una dosis aguda de alcohol en otros núcleos que contienen al péptido maduro TRH (núcleo dorsomedial y el área preóptica), a la par de la EM, (Segerson, et. al., 1987).

En el presente estudio la disección de la zona de interés, se realizó empleando un criostato y un sacabocados del diámetro preciso para delimitar al máximo la EM y excluir incluso células positivas a PPII en el núcleo más cercano (núcleo arcuato) (Heuer et al. 1998). Para corroborar la especificidad de la respuesta en este estudio se realizó el ensayo enzimático y la cuantificación de proteína en otras dos regiones del hipotálamo: el núcleo dorsomedial, receptor de elongaciones de tanicitos $\alpha 1$, y el área preóptica que es una región hipotalámica más alejada de los tanicitos. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los animales control y los experimentales a las 16, 20 o 24 horas en ninguno de los dos núcleos. Estos resultados corroboran que la enzima PPII localizada en los tanicitos de la EM es la responsable de la regulación de la cantidad de TRH liberado al sistema portal hipofisario en respuesta a una exposición aguda de alcohol. Probablemente exista una regulación adicional en otras regiones del hipotálamo que expresen a la enzima y que no fueron consideradas en este estudio (Heuer, et. al., 1998).

Congruente con lo anterior, los datos obtenidos sobre el aumento en la expresión de TRH en el NPV 20 horas después del tratamiento con alcohol, y la activación a la par de PPII en la EM; se sugiere que la proteína precursora de TRH se sintetiza, viaja a la terminal nerviosa y se libera a la sangre portal para aumentar la cantidad de sustrato (TRH) disponible para PPII. En respuesta a este aumento, se elevan los niveles de síntesis de PPII y posteriormente su actividad enzimática, para generar una disminución subsiguiente en la expresión de TRH y del péptido liberado a la AP; modulando de esta manera al eje tiroideo como se ha reportado en respuesta a tirotoxicosis (Lazcano y Sánchez, 2014) y en ayuno prolongado (Lazcano, 2015). A pesar de que el aumento en

la síntesis de PPII resulta transitorio (no encontró a las 24 horas), el aumento en la actividad de la enzima en la EM se mantiene constante, e incluso se intensifica 24 horas después de la inyección ip. de alcohol, independientemente de que no se esté sintetizando nueva proteína. Lo anterior demuestra la importancia de la PPII como mecanismo regulador del eje HHT ante una condición estresante como lo es una dosis aguda de alcohol en el organismo.

El incremento en los niveles séricos de TSH determinados mediante la técnica de RIA (datos no publicados, Lab. Neuroend. Mol, INPRFM) corroboran la liberación del péptido TRH tras ser sintetizado en el NPV antes de que la PPII module la actividad del eje HHT al controlar la cantidad de péptido que llegará a la AP. Se propone que el aumento en la liberación de TSH acarrea la síntesis y liberación de hormonas tiroideas que a su vez modulan la expresión de PPII y TRH (Kakucska. Rand y Lechan, 1992; Guissouma, et. al., 2000), mediante la participación de la enzima D2 como mecanismo regulador adicional (Marsil, et. al., 2011). Aunque el efecto más conocido de la TSH es la inducción y síntesis de las hormonas tiroideas en la glándula tiroides, está pudiera estar involucrada también en el reajuste energético en respuesta a una dosis aguda de alcohol por su acción directa en otros órganos como el tejido adiposo pardo y blanco donde se expresa su receptor (TSH-R) (Martínez de Mena, et. al., 2014).

La administración aguada de alcohol puede generar una inhibición en la actividad del eje tiroideo a tiempos cortos (Zoeller, et. al.; 1992, 1994), sin embargo, la reactivación parcial del eje tiroideo a tiempos tardíos, pudiera significar un ejemplo de homeostasis reactiva, ya que el sistema induce una respuesta (en un rango de variación) ante una dosis aguda de alcohol para reajustar al metabolismo a sus valores normales. Por lo tanto, el estado de hipotermia generado por una dosis aguda de alcohol en los organismos debe ser contrarrestado mediante la producción extra de calor. Lo anterior sería posible por el efecto que tienen las hormonas tiroideas sobre las enzimas UCP1 en el tejido pardo para la producción adicional de calor en organismos homeotermos como el ser humano y la rata (Silvestri, Schiavo, Lombardi y Goglia, 2005; Obregón, 2014).

Por otra parte, el metabolismo del alcohol por medio de la enzima ADH en mayor medida y por el sistema MEOS y el complejo catalasa-peróxido de hidrogeno, implica un mayor gasto energético en órganos como el hígado y el cerebro (Goodman y Gilman, 2011), en consecuencia, es indispensable una regulación energética. Las hormonas tiroideas aunque son de naturaleza liposoluble, son transportadas al interior de la células para aumentar la síntesis de ATP, a través de varios transportadores específicos (OATPC1, MCT8 y MCT10) (Heuer, et. al., 2005). De acuerdo a lo anterior, se ha observado que la administración de hormonas tiroideas acelera el ritmo del oxidación y metabolismo del alcohol; por lo que esta hormona ha sido utilizada con el propósito de acelerar la recuperación de individuos afectados por el consumo crónico de esta bebida (Niubó, Rodríguez, Gorguet y Cardona) y que han presentado una desensibilización de la AP en respuesta a TRH (de Gortari, et. al., 2002). No conforme, la administración de T3 y TSH en pacientes con dependencia al alcohol, reduce su consumo y los efectos nocivos que genera su privación (ansiedad, depresión y agresividad) (Leggio, et. al., 2008; Aun, et. al., 2014).

En el presente estudio se decidió evaluar la actividad de PPII en la AP debido a su sensibilidad al estado tiroideo del organismo y a su función homeostática en respuesta a señales del cerebro y la periferia gracias a su alta vascularización. Bauer (1987) planteo que la PPII localizada en la AP contribuye en la retroalimentación negativa que las hormonas tiroideas generan en el eje HHT. Sin embargo, Cruz, et. al., (2008) ha propuesto que la síntesis y actividad de PPII en la AP no está relacionada con la secreción de TSH. Las evidencias señalan que la enzima PPII está presente en los lactótrofos (células de la AP que sintetizan y liberan PRL) o incluso en los somatótrofos (células de la AP que sintetizan y liberan GH), pero no en tirótrofos (células de la AP que sintetizan y liberan TSH). Por lo tanto, es posible que el aumento en la expresión y actividad de PPII en la AP debido a una dosis aguda de alcohol no esté vinculado con la regulación del eje tiroideo, sino con la capacidad de controlar la liberación de PRL y GH. A pesar de las diferencias descritas, no se descarta por completo la participación de la PPII en la AP como un mecanismo regulatorio adicional del eje tiroideo en una condición aguda de alcohol. El aumento en la actividad de PPII previo a su síntesis a diferencia de lo que sucedió en la EM, sugiere una desregulación en la vía de síntesis de PPII ya que su

ARNm se está expresando pero no resulta activa la proteína a las 16 horas después de la administración ip. de alcohol.

Muchos procesos moleculares, celulares, bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos, genéticos y conductuales son similares en especies vertebradas como los mamíferos respecto a las funciones vitales, por lo que puede extenderse a la biología humana (Detrich, 2014). Si realizamos una analogía entre el modelo experimental de este estudio y condiciones humanas, considerando que los animales fueron administrados en una sola dosis con 3g por kg de masa corporal para inducir la narcosis, encontramos que esta dosis es equivalente a un ser humano promedio (75kg) con 225g de alcohol aproximadamente, es decir con 10 cubas estándar. Este dato resulta interesante, ya que la Encuesta Nacional de Adicciones reveló que la mayor parte de la población mexicana que consumió alcohol en el 2011 (27 millones de mexicanos entre 12 y 65 años) lo hizo con poca frecuencia pero en grandes cantidades hasta llegar a estados de embriaguez en cada ocasión; condición representada en este paradigma experimental. No obstante, extrapolar datos animales a humanos debe tratarse con prudencia. La vida de otros animales es más corta, por lo tanto el tiempo que el alcohol pasa en el organismo representa una fracción mucho más grande de la vida del animal que una dosis similar en un ser humano. A pesar de que la velocidad con la que desaparece del organismo no es tan diferente de la velocidad en los seres humanos. Por otro lado, la vía de administración puede influir en los datos obtenidos y por lo tanto en el análisis de los resultados. Para saber con mayor precisión la condición de los animales se debe calcular el grado de alcoholemia.

A pesar de las posibles limitaciones ya descritas para este estudio, los resultados permiten clarificar la actividad de PPII en los tanicitos de la EM como un mecanismo de plasticidad cerebral que regula al eje tiroideo tras una administración aguda de alcohol. Es importante subrayar una vez más que el funcionamiento óptimo de células TRHérgicas permitirá la homeostasis energética, y por lo tanto una respuesta adecuada ante los estímulos estresantes, tanto fisiológicos como psicológicos. Debido a lo anterior, se podría considerar eventualmente, la inactivación de PPII como un blanco para el desarrollo farmacológico (Pascual, 2005).

Para finalizar, no se debe perder de vista que el estudio de la Psicología es un proceso que requiere entender los mecanismos emocionales, cognitivos y conductuales de un individuo, delimitarlos en un contexto sociocultural y sustentarlos en un correlato biológico. De esta manera se apoyará de manera integral al “cliente” al ser tratado en la clínica, escuela o ambiente laboral donde se desempeñe. Aplicando lo anterior, se debe entender y explicar a quién lo consume que el alcohol genera efectos sobre su cerebro que se traducen en cambios emocionales, de pensamientos y conducta; y por lo tanto se debe trabajar con cada una de estas esferas para que nuevamente el organismo regrese a un punto de equilibrio, de la misma manera que el sistema neuroendocrino mantiene la homeostasis.

CONCLUSIÓN

Se concluye que el aumento en la actividad de PPII localizada en los tanicitos de la EM puede promover la remoción del péptido (TRH) del sistema portal hipofisiario, evitando la desensibilización de los receptores a TRH en la AP por exceso de ligando, dejando lista a la célula blanco para recibir una nueva señal y en consecuencia modular la función del eje tiroideo para contender con los efectos perniciosos de una dosis aguda de alcohol.

BIBLIOGRAFÍA:

- Alfonso-Loeches, S. y Guerri, C. (2011). Molecular and behavioral aspects of the actions of the alcohol on the adult and developing brain. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 48 (1), 19-47.
- American Psychiatric Association (2014). Manual diagnóstico y estadístico de trastornos mentales. Quinta edición: Copyring American Psychiatric Association. EE. UU.
- Aoun, E., Lee, M., Haass-Koffler, C., Swift, R., Addolorato, G., Kenna, G. y Leggio, L. (2015). Relationship between the Thyroid axis and alcohol craving. *Alcohol and Alcoholism*. 50 (1): 24-29.
- Aragón, C., Miquel, M., Correa, M. y Sanchis-Segura, C. (2002). Alcohol y metabolismo humano. *Adicciones*. 4 (1): 23-42.
- Ayesta, F. (2002). Bases bioquímicas y neurobiológicas de la adicción al alcohol. *Adicciones*. 14, 63-78.
- Balkan, W., Tavianini, M., Gkonos, P. y Roos, B. (1998). Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology*. 139 (1): p. 252-259.
- Barona, J. (2003). Evaluación histórica y conceptual del alcoholismo. En García, V. (2003). *Manual SET de alcoholismo*: Editorial Medica Panamericana. España. 9-20.
- Bauer, K. (1987). Adenohypophyseal degrading of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormone. *Nature*. 330: 375-377.
- Bauer, K., Nowak, P. y Kleinkauf, H. (1981). Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thyroliberin at pyroglutamyl-histidine bond. *European Journal of Biochemistry*. 118:173-176.
- Bear, M. (2008). *Neurociencia: La exploración del cerebro*: Lippincott Williams y Wilkins. China.
- Berson, S. y Yalow, R. (1967). Radioimmunoassays of peptide hormones in plasma. *The New England Journal of Medicine*. 277: 640-647.
- Biggins, A. Perry, E., McDermott, J., Smith, A., Perry, R. y Edwardson, J. (1983). Post mortem levels of thyrotropin-releasing hormone and neurotensin in the amígdala in Alzheimer's disease, schizophrenia and depression. *Journl of the Neurological Sciences*. 58 (1): 117-122.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 7:248-254.

- Brailowsky, S. (1995). Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología: Fondo de Cultura económica. México.
- Calderón, G. (2003). Perspectiva histórica del alcoholismo en México. En Velasco, R. (2003). *Alcoholismo: visión integral*: Trillas. México, 48-63.
- Carlson, N. (2006). Fisiología de la conducta: Pearson Adison Wesley. España.
- Carroll, C. (2000). *Drugs in Modern Society*. Mc. Graw-Hill. USA.
- Charli, J y Joseph-Bravo P. (2008). El cerebro, la comunicación intercelular y los péptidos. Una ventana al quehacer científico. 25 años del Instituto de Biotecnología (IBT).
- Charli, J., 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*: 39-64.
- Charli, J., Vargas, M., Cisneros, M., De Gortari, P., Baeza, M., Jasso, P., Bourdais, J., Pérez, L., Uribe, R. y Joseph-Bravo, P. (1998). TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 6:45-57.
- Chávez-Gutiérrez, L., Matta-Camacho, E., Osuna, J., Horjales, E., Joseph-Bravo, P., Maigret, B. y Charli, J. (2005). Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1family. *The Journal of Biological Chemistry*. 7: 1185-1190.
- Chomczynskil, P., Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature protocols*. 1(2):562-581.
- Clark, A. y Little, H. (2004). Interactions between low concentrations of ethanol and nicotine on firing rate of ventral tegmental dopamine neurones. *Drug Alcohol Depend*. 75 (2):199-206.
- Costall, B., Hui, S., Metcalf. G. Y Naylor, R. (1979). A study of the changes in motor behaviour by TRH on intracerebral injection. *European Journal of Pharmacology*. 53 (2):143-150.
- Cruz, R., Vargas, M., Uribe, R., Pascual, I., Lazcano, I., Yiotakis, A., Matziari, M., Joseph-Bravo, P y Charli, J. (2008). Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 29:1953-1964.
- Cummins, P. y O'Connor, B. (1998). Pyroglutamyl aminopeptidase:An overview of the three know enzymic forms. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 1429:1-17.

- De Gortari, P., Cisneros, M., Medellín, M. y Joseph-Bravo, P. (2002). Chronic ethanol or glucose consumption affects hypothalamic and limbic TRH metabolism in dams and their pups. *Neurochemistry International*. 41 237-249.
- De Gortari, P., Mendez, M., Rodríguez-Keller., Pérez L. y Joseph-Bravo, P. (2000). Acute ethanol administration induces changes in TRH y proenkephalin expression hypothalamic and limbic región of rat brain. *Neurochemistry International*. 37 (5): 483-496.
- De Gortari, P., Romero, F., Cisneros, M. y Joseph-Bravo, p. (2005). Acute administration of alcohol modulates pyroglutamyl aminopeptidasa II activity and mRNA levels in rat limbic regions. *Neurochemistry International*. 46: 947-356.
- Detrich, R. (2014) Modelos animales en la investigación de los efectos del alcohol. Universidad de Colorado, Alcohol Research Center. Obtenido de http://www.rsoa.org/lectures/esp/2_05/2_05es.pdf el día 18 de febrero de 2014.
- Dickerman, S. (1981). Neuroendocrinología “El eslabón perdido”. *Revista médica de Honduras*. 49: 98-102.
- Dickerman, S., Kedzik, G., Gelato, M., Chen, H. y Meites, J. (1974). Efecto del haloperidol on serum and Pituitary Prolactin, LH and FSH, and hipothalamic PIF and LRF. *Neuroendocrinology*. 9: 332-340.
- Elmore, M., Griffiths, E., O’Connor, B. and O’Cuinn, G., (1990). Futher characterization of the sustrate specificity o a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase form guinea-pig brain. *Neuropeptides*. 15:31-36.
- Elvir, J. (1993). Efecto del alcohol sobre las membranas biológicas. Obtenido de <http://www.bvs.hn/RMH/pdf/1993/pdf/Vol61-1-1993-4.pdf> el día 10 de Agosto de 2015.
- Engleman, E., Rodd, Z., Bell, R., Murphy, J. (2008). The role of 5-HT3 receptors in drug abuse and as a target for pharmacotherapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 7(5):454-467.
- Fekete, C. y Lechan, R. (2007). Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Fronteris in Neuroendocrinology*. 28: 97-114.
- Fekete, C. y Lechan, R. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*. 35 (2): 159-194.
- Flamant, F., Baxter, J., Forrest, D., Refetoff, S., Samuels, H., Scanlan, T., Vennström, B. y Samarut, J. (2006). International Union of Pharmacology. LIX. The Pharmacology and Classification of the nuclear receptor superfamily: Thyroid hormone receptors. *Pharmacological Reviews*. 58 (4): 705-711.

- Flerkó, B. (1971). Control of gonadotropin secretion in the female. En Martini, W. y Ganong, I. (1971) *Neuroendocrinology*: Academy press. EUA.
- Freund, T., Katona, I. y Piomelli, D. (2003). Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. *Physiological Reviews*. 83(3):1017-1066.
- Frías, J., Rodríguez, J., Torres, M., Ruiz, E. y Ortega, E. (2000). Effects of acute alcohol intoxication on pituitary-gonadal axis hormones, pituitary-adrenal axis hormones, β -endorphin and prolactin in human adolescents of both sexes. *Life Sciences*. 67 (9): 1081-1086.
- Friedman, T. y Wilk, S. (1985). The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 132:187-794.
- Garat, B., Miranda, J., Charli, J. y Joseph-Bravo, P. (1985). Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides*. 6: 27-40.
- Gary, K., Sevarino, K., Yarbrought, G., Prage, J., y Winokur, A. (2003). The Thyrotropin releasing hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based-therapeutics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 305:410-416.
- Givens, B., McMahon, K. (1995). Ethanol suppresses the induction of long-term potentiation in vivo. *Brain Research*. 688: 27-33.
- González, G. (1999). Neuroendocrinología. *Revista peruana de Endocrinología y Metabolismo*. 4 (2): 57-82. Consultada el 20 de Agosto en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/endocrinolog%C3%ADa/v04_n2/neuro%281%29.htm
- González, M. (2009). Características del temperamento y carácter en estudiantes universitarios con patrón de consumo de bebedor problema. Tesis de Licenciatura en Psicología. UNAM. México, D. F.
- Goodman A. y Gilman L. (2011). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*: Mc Graw-Hill. México. 10 pp. 437-450.
- Green, J. y Harris, G. (1947). The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *Journal of Endocrinology*. 5: 136-46.
- Guillemin, R., Burgus, R. y Vale, W. (1971). The hypothalamic hypophysiotropic thyrotropin-releasing factor. *Vitamins and hormones*. 29: 1-39.
- Guissouma, H., Becker, N., Seugnet, I. y Demeneix B. (2000). Transcriptional repression of TRH promoter function by T3: analysis by in vivo gene transfer. *Biochemistry and Cell Biology*. 78: 155-163.

- Gutiérrez, M., de Gortari, P., López, 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.
- Guyton, .A. (2011). Tratado de fisiología médica: Nueva editorial Interamericana. México.
- Harris, G. (1972). Humours and hormones. *Journal of Endocrinology*. 53 (2):2-23.
- Heuer, H., Ehrchen, J., Bauer, K. y Shafer, M. (1998). Regio-specific expression of thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *European Journal of Neuroscience*. 10: 1465-1478.
- Heuer, H., Maier, M., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E., Visser, T. y Bauer, K. (2005). The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology*. 146 (4): 1701-1706.
- Heuer, H., Schafer, M., O'donnell, D., Walker P and Bauer, K. (2000). Expression of thyrotrophin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the Central Nervous System of rats. *The Journal of Comparative Neurology* 428:319–336.
- Hollener, A. N., Monden, T., Flynn, T., Boers, M., Cohen, O. y Wondisford, F. (1995). The human thyrotrophin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular Endocrinology*. 540-550.
- Horita, A. (1998). An Update in the CNS Actions of TRH and its Analogs. *Life Science*. 62:1443-1448.
- Horstmann, E. (1954). Die faserlia des selachiergehirns. *Zeitschrift für Zelforschung*. 39: 588-617.
- Houghton, E. y Roche, A. (2001). *Learning about drinking*: Brunner Routledge. Taylor and Francis Group. Estados Unidos de América, 10-21.
- Izquierdo, M. (2002). Intoxicación alcohólica aguda. *Adicciones*. 14 (1): 175-193.
- Joseph-Bravo, P. y De Gortari, P. (2008). El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. *Una ventana al quehacer científico*. 25 años del Instituto de Biotecnología (IBT): pp. 65-76.
- Joseph-Bravo, P., Cote-Velez, A., Perez-Martinez, L. (2006) Integration of neuroendocrine signals that regulate the activity of hypophysiotropic peptides. *Molecular Endocrinology*. 1:1-24.
- Joseph-Bravo, P., Jimes, L., Uribe, R. y Charli, J. (2015). TRH, the firts hypofhysiotropic releasing hormone isolated: control of the pituitary-thyroid axis. *Journal of Endocrinology*. 226. 85-100.

- Joseph-Bravo, P., Lourdes, C., Charli, J. y Kordon, C. (1979). Subcellular distribution of the brain peptidase degrading lutenizing hormone releasing (LHRH) and thyrotropin releasin hormone (TRH). *Brain Research*. 166:321-329.
- Kakucska. I., Rand, W. y Lechan, R. (1992). Thyrtropin-releasing-hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by both triiodothyronine and thyroxine. *Endocrinology*. 130 (5): 2845-2850.
- Kelly, J., Slator, G. Tipton, K., Williams, C. y Bauer, K. (1999). Development continuos, fluorometric coupled enzyme assay for thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme. *Analytical Biochemistry*. 15:195-202.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 16746-16751.
- Klieverik, L., Coomans, C., Endert, E., Sauerwein, H., Havekes, L., Voshol, P., Rensen, P., Romin, J., Kalsbeek, A. y Fliers, E. (2009). Thyroid hormone effects on whole-body energy homeostasis and tissues-specific fatty acid uptake in vivo. *Endocrinology*. 150 (2): 5639-5648.
- Ladero, J. (1998). Farmacología del alcohol, intoxicación aguda, en Lorenzo, P., Ladero, J., Leza & Lizasoain, I. (1998). *Drogodependencia, farmacología, patología, psicología, legislación: Panamericana*, España.
- Lawrence, A. (2010). Regulation of alcohol-seeking by orexin (hypocretin) neurons. *Brain Research*. 1314:124-129.
- Lazcano, I. (2010). Papel de la Piroglutamil Peptidasa II en el septum medial, en un modelo de anorexia. Tesis que para obtener el grado académico de Maestro en Ciencias Biológicas (Experimental). México. Facultad de Ciencias: UNAM.
- Lazcano, I. (2015). Regulación y papel de la priroglutamil peptidase II durante la respuesta del eje tiroideo al ayuno en la rata. Tesis que para obtener el grado academico de Doctor en Ciencias Biologicas (Experimental). México Facultad de Ciencias: UNAM.
- Lazcano. I., Cabral, A., Uribe, R., Jaimes-Hoy, L., Perello, M., Joseph-Bravo, P., Sánchez, E. y Charli, J. (2014). Fasting enhances Pyroglutamil Peptidase II activity in tanycytes of the mediobasal hypothalamus of male adult rats. *Endocrinology*. 156 (7): 2713-2723.
- Lechan, R., Fekete, C. (2006). The TRH neurons: a hypotalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*. 153: 209-35.
- Leggio, L., Ferrulli, A., Cardone, S., Malandrino, N., Mirijello, A., D'Angelo C., Vonghia L., Miceli, A., Capristo, E., Kenna, G., Gassbarrini, G., Swift, R. y Addolorato, G. (2008). Relationship Between the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis and Alcohol

Craving in Alcohol-Dependent Patients: A Longitudinal Study. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 32 (2): 2047-2053.

Macek, M. (2014). Bebidas alcoholicas. *Zona diet.com*. Obtenidos de: <http://www.zonadiet.com/bebidas/index.php>

Maldonado, R. (2003). *Molecular Biology of Drug Addiction*: Humana Press. Estados Unidos de América.

Marsil, A., Sánchez, E., Singuru, P., Harmey, J., Zavacki, A. Lechan, R. y Larsen, P. (2011). Thyroxine-induced expression of pyroglutamyl peptidase II and inhibition of TSH release precedes suppression of TRH mRNA and requires type 2 deiodinase. *Journal of Endocrinology*, 211: 73-78.

Martínez de Mena, R., Anedda, A., Cadenas, S. y Obregón, M. (2015). TSH effects on thermogenesis in rat brown adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 404: 51-158.

Medina-Mora, M., Natera, G., Borgues, G., Craviota, P., Fletz, C. y Tapia-Conyer, R. (2001). Del siglo XX al tercer milenio. Las adicciones y la salud pública: drogas, alcohol y sociedad. *Salud mental*. 24, 4; 3-19.

Mendieta, L. (1991). Ensayos sobre el alcoholismo entre las razas indígenas de México. En Menéndez, E. (1991). *Antropología del alcoholismo en México*: Ediciones de la Casa Chata. México.

Nelson, D. y Cox, M. (2015). *Lehninger: Principios de bioquímica*: Omega. México.

Nie, Z. y Liu, Z. (1991). Effect of injection of thyrotropin-releasing hormone into nucleus accumbens on pain discharges in nucleus parafascicularis of the thalamus in rats. *Journal of Tongji Medical University*. 11 (4): 198-203.

Nillini, E. (2010). Regulation of the hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 31:134-156.

Nillni, E., Severino, K. (1999). The biology of pro-thyrotropin releasing hormone derived peptides. *Endocrinology Reviews*. 20(5): 599-648.

Niubó, M., Rodríguez, O., Gorguet, M. y Cardona, G. (1999). Efecto del tiroides desacado sobre la ingestión de alcohol en ratas wistar alcohólicas crónicas. *Medisan*. 3 (3): 48-53.

O'Connor, B. y O'Cuinin, G. (1984). Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of a guinea-pig brain. *European Journal of Biochemistry*. 144:271-278.

O'Leary, R. y O'Connor, B. (1995). Thyrotropin-Releasing-Hormone. *Journal of Neurochemistry*. 65:953-963.

- Obregon, M. (2014). Adipose tissues and thyroid hormones. *Frontiers in Physiology*. 5: 479-490.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Nota descriptiva N° 349. Obtenido de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/> el 8 de abril 2015.
- Palkovits, M. y Brownstein M. (1988). *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*: Elsevier. Estados Unidos de América.
- Pascual, S. (2005). Purificación y caracterización parcial del primer inhibidor natural de Piroglutamil Aminopeptidasa II (enzima que degrada al TRH), aislado del anélido marino *Hermodice carunculata*, Pallas, 1766 (Polychaeta). Tesis en opción a grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Cuba. Facultad de biología. Centro de estudios de proteínas. Universidad de la Habana.
- Pomares, S. (2013). ¿Qué ocurre cuando se ingiere alcohol?. Blog de un bioquímico: "Un lugar don divulgar la ciencia". Consultado el 25 de marzo de 2015 en <https://blogdeunbioquimico.wordpress.com/2013/08/18/que-ocurre-cuando-se-ingiere-alcohol/>.
- Rodríguez, D. (2010). Alcohol y cerebro: Absalon Ediciones. México. 21-22.
- Rodríguez, E., Blazquez, J., Pastor, F., Pelaez, B., Peña, P., Peruzzo, B. y Amat, P. (2005). Hypothalamic Tanycytes: A key component of brain-endocrine interaction. *International Review of Cytology*. 27 pp. 89-163.
- Rodríguez, V., Patiño, L., Vargas, Y., Sánchez, E., Joseph-Bravo, P. y Charli, J. (2014). TRH regulates action potential shape in cerebral cortex pyramidal neurons. *Brain Research*. 1571: 1-11.
- Ronald, K., Mirshahi, T. y Woodward, J. (2001). Ethanol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors is reduced by site-directed mutagenesis of a transmembrane domain phenylalanine residue. *Journal Biology Chemistry*. 276(48):44729-44735.
- Rosler, R. (2014). El hipotálamo y sus funciones. Asociación Educar: Ciencias y Neurociencias Aplicadas al Desarrollo Humano. Consultado el 18 de Agosto de 2015 en <http://asociacioneducar.com/hipotalamo-funciones>.
- Sánchez, E., Vargas, M., Singru, P., Pascual, I. Romero, F., Fekete, C., Charli, J., y Lechan, R. (2009). Tanycite Pyroglutamyl Peptidase II Contributes to Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis through Glial-Axonal Assosiations in the Median Eminence. *Neuroendocrinology*, 150: 2283-2291.
- Sánchez, L. Pérez, B., Castellano, M. y Del Río, C. (2003). Epidemiología del alcoholismo: prevalencia y patrones de consumo. En García, V. (2003). *Manual SET de alcoholismo*: Editorial Medica Panamericana. España. 9-20.
- Sanz, N., Arias, V., Trenchs, V., Curcoy, A., Costa, J. y Luaces, C. (2009). Consulta por intoxicación etílica aguda en un servicio de urgencias pediátricas. *Anales de pediatría*. 70: 132-136.

- Sattin, A., Pekary, A., Lloyd, R. (1999). TRH in Therapeutic vs Nontherapeutic Seizures: Affective and Motor Functions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 62:575-583.
- Schally, A., Redding, T., Bowers, C. y Barrett. (1971). Isolation and Properties of Porcine Thyrotropin-releasing Hormone. *The Journal of Biological Chemistry*. 244:4077-4088.
- Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J. and Bauer, K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 91:9534-9538.
- Schmtmeier, S., Thole, H., Bader, A. y Bauer, K. (2002). Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *European Journal of Biochemistry*. 269: 1278-1286.
- Schomburg, L. y Bauer, K. (1995). Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the Messenger RNA levels of the thyrotropin releasing hormone (TRH) receptor and the TRH degrading ectoenzyme. *Endocrinology*. 136:3480-3485.
- Segerson, T., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H., Wu, P., Jack, I. y Lechan, R. (1987). Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in the rat brain in situ hybridization. *Endocrinology*. 121 (1): 98-107.
- Silvestri, E., Schiavo, L., Lombardi, A. y Goglia, F. (2005). Thyroid hormones as molecular determinants of thermogenesis. *Acta Physiologica*. 184 (4): 265-283.
- Taylor, R. y Burt, D. (1981). Properties of (3-Me-His²) TRH binding to apparent TRH receptors in the sheep central nervous system. *Brain Research*. 218 (2): 207-217.
- Thaller, V., Marusic, S., Katinic, K., Brulijan, D., Golik-Gruber, V. y Potkonjak, J. (2003). Factores biológicos en pacientes con Trastorno de Estrés Postraumático (PTSD) y Alcoholismo. *The European journal of psychiatry*. 17 (2): 88-100.
- Vargas, K. (2013). Localización de la enzima que degrada a TRH, la piroglutamil peptidasa II (PPII) en el hipocampo de la rata adulta. Tesis que para obtener el grado académico de Bióloga. México. Facultad de Ciencias: UNAM.
- Vargas, M., Herrera, J., Charli, J. y Joseph-Bravo, P. (1992). *Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord and organs*. *Peptides*. 13: 255-260.
- Villar, R. (2011). Psychologue Clinicienne, PsychoNeurothérapeute. Consultado el 12 de julio de 2015 en <http://www.rvd-psychologue.com/es/el-cerebro-el-circuito-de-recompensas.html>.

- Wilk, S. y Wilk, E. (1989). Pyroglutamyl peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme: purification and specificity studies of the rabbit brain enzyme. *Neurochemistry International*. 442:138-158.
- Wong, A. y Álvarez, M. (2013). Hormonas, cerebro y conducta. Notas para la práctica de la Psicología en la Endocrinología. *Revista Cubana de Endocrinología*. 24. (1): 57-69.
- Yen, P. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*. 81 (3): 1097-1142.
- Zoeller, R. y Rudeen P. (1992). Ethanol blocks the cold-induced increase in thyrotropin-releasing hormone mRNA in paraventricular nuclei but not the cold-induced increase in thyrotropin. *Molecular Brain Research*. 13, 321-330.
- Zoeller, T., Simonyi, A., Butnariu, O., Rletcher, D., Rudden, K., McCrone, S., Peterson, S. (1994) Effects of acute ethanol administration and cold exposure on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrine*. 3: 38-47.
- Zorumski, C., Mennerick, S. y Izumi, Y. (2014). Acute and chronic effects of ethanol on learning-related synaptic plasticity. *Alcohol*. 48(1): 1-17.

Anexo 1. Purificación de ARN total partiendo de tejidos congelados

Este protocolo es original de Chomczynski y Sacchi (2006) y modificado por Sánchez-Jaramillo (no publicado) para rata. Todas las soluciones se prepararon con agua desionizada tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) al 0.1% esterilizada dos veces. El material utilizado fue horneado previamente durante 12 horas a 120°C (mínimo 6 horas a 80°C).

- 1) Preparar 50ml de agua DEPC y 50ml de etanol absoluto en tubos falcón, un tubo falcón de 15ml o un vaso de precipitados de 40ml, una gasa estéril y una bandeja con hielo.
- 2) Rociar RNase zap (Ambitón) atomizador en el vástago del sonicador (cubrir toda la superficie). Dejar penetrar aproximadamente 10 minutos.
- 3) Verter el agua DEPC (igual que en el paso anterior), posteriormente el etanol absoluto y dejar evaporar 5 minutos.
- 4) Preparar 10ml de Sol D + 70µl de β-mercaptoetanol para 50 muestras o 4ml de Solución D + 28µl por cada 20 muestras de 150µl (AP y PVN de rata) y 100µl (EM de rata). Ver tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes de los reactivos por región para purificación de ARN.

AP de rata	EM de rata	PVN de rata
150 µl Sol D	100 µl Sol D	150 µl Sol D
1/10 NaOAc 2M (15µl)	1/10 NaOAc 2M (10µl)	1/10 NaOAc 2M (15µl)
1 vol. Fenol (150µl)	1 vol. Fenol (100µl)	1 vol. Fenol (150µl)
0.35 vols. CCL ₃ :isoamilico (49:1) (52.5µl)	0.35 vols. CCL ₃ :isoamilico (49:1) (35µl)	0.35 vols. CCL ₃ :isoamilico (49:1) (52.5µl)

Total: 367.5µl

345µl

367.5µl

1 vol. de isopropanol (150µl)	1 vol. de isopropanol (100µl)	1 vol. de isopropanol (250µl)
1 vol. de etanol al 70% (150µl)	1 vol. de etanol al 70% (100µl)	1 vol. de etanol al 70% (250µl)

- 5) Sonicar muestras en solución D (stock: 4M tiocianato de guanidina, 0.50% sarcosly, 0.1M β-mercaptoetanol, 0.025M citrato de sodio pH 7.2) durante lapsos no mayores a 10 segundos, colocando la muestra en hielo durante cada periodo de sonicación para evitar la degradación del ARN contenido en la muestra. Repetir este proceso hasta lograr la desintegración total del tejido.
- 6) Enjuagar sonicador con agua DEPC entre muestra y muestra para evitar la contaminación entre las mismas.
- 7) Adicionar 1/10 de volumen de acetato de sodio 2M (pH 4.0) a la muestra sonicada y agitar por 3 segundos en el vórtex. Mantener muestras en hielo.
- 8) Agregar un volumen de fenol saturado frio con H₂O DEPC y agitar con vórtex 3 segundos. Mantener en hielo. Nota: El fenol deshace el unigel y debe estar cubierto de la luz para evitar la oxidación y mantenerse en hielo.
- 9) Agregar 0.35 volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico (49:1) con cuidado porque gotea fácilmente y agitar con vórtex durante 1 minuto. Se debe observar una consistencia lechosa, de no ser así, se agregan otros 10µl de cloroformo-alcohol isoamílico.
- 10) Dejar 15 minutos en hielo y centrifugar a 13,500 rpm durante 20 minutos a 4°C. en este lapso de tiempo de deben rotular tubos nuevos para recuperar sobreadante. Nota: IBT es la centrifugación es a 10,000 rpm 20 min a 4°C (centrifuga Ionovan).
- 11) Recuperar fase acuosa y determinar volumen recuperado (se recuperan aproximadamente 100 µl de EM, 150 µl de PVN y AP. Nota: Evitar el uso de puntas grandes para NO contaminar fase acuosa con la orgánica ni tomar el volumen en una sola extracción.

- 12) Adicionar un volumen de isopropanol frío (en hielo o almacenado previamente en el congelador) y mezclar.
- 13) Precipitar toda la noche.
- 14) Centrifugar 4 °C a 13,500 rpm durante 30 minutos. Nota: IBT es a 14,000 rpm (centrifuga Ionovan).
- 15) Recuperar sobrenadante (SN) con micropipeta de 200 µl poco a poco como en el paso 11. Retirar la mayor cantidad de isopropanol posible.
- 16) Resuspender la pastilla cuidadosamente en 250 µl (150 µl PVN y AP; 100 µl EM) de etanol frío al 70% en agua destilada autoclaveada 2 veces (no DEPC). Se debe colocar primero la mitad del volumen, recuperar el SN y luego añadir el volumen restante para lavar las paredes del tubo sin tocar la pastilla. Agitar en vórtex durante 3 segundos.
- 17) Centrifugar 4 °C a 13,500 rpm durante 10 minutos.
- 18) Repetir el lavado con el mismo volumen del lavado anterior para centrifugar de nuevo durante 7 minutos en las mismas condiciones. Recuperar SN y almacenarlo en el tubo del paso 16.
- 19) Almacenar SN's de los pasos 15, 16 y 18 a 20°C hasta su procesamiento.
- 20) Secar las muestras en savant durante 5 minutos o a temperatura ambiente durante 10 minutos máximo (revisar a los 5 minutos si ya no hay residuos de etanol para resuspender o guardar el pellet inmediatamente).
- 21) Almacenar en forma de pastilla a -20°C o resuspender. Se deben resuspender las muestras en 10 µl de agua DEPC justo antes de tomar la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro (2 µl de muestra + 98 µl de agua Milli Q). Nota: Resuspender las muestras para espectrofotómetro en agua DEPC da valores de absorbancia más altos que los reales en la muestra a 230 nm por lo que debe emplearse agua Milli Q para la toma de esta lectura.
- 22) Después de 24 horas de reposo de los sobrenadantes se deben procesar por separado los tubos de SN's de isopropanol y etano al 70% para determinar la cantidad perdida (no recuperada) del tubo original (pasos 15,16 y 18).

- 23) Si en alguno de los tubos con SN de isopropanol se observa una pastilla, botón o grumos esparcidos en el fondo del tubo se continuara con el procedimiento de lavado de etanol (paso 16).
- 24) Si alguno de los tubos con SN de etanol presenta pastilla, botón o grumos esparcidos en el fondo del tubo se procederá a retirar el etanol con cuidado y secar por completo (17).
- 25) El ARN recuperado de estos últimos tubos se resuspende en un volumen menor al utilizado para el tubo que contiene la muestra inicial, es decir, si se emplearon 10µl de agua DEPC para resuspender AP en el tubo inicial, se utilizarán 5 µl de agua DEPC (dependiendo del tamaño del producto recuperado).
- 26) La cuantificación total del ARN extraído, se realiza de dos formas: A) tomando 1 µl de la muestra resuspendida en agua DEPC y midiendo la absorbancia en un espectrofotometro de alta sensibilidad (NANODROP) o bien b) tomando 2 µl de la muestra + 98µl de agua Milli Q y analizando la absorbancia de la muestra a 230nm (sales), 260nm (ADN/ARN) y 280nm (proteína).
- 27) Calcular el factor de dilución para determinar rendimiento (µg totales) y concentración (µg/µl) del ARN obtenido en cada preparación.

Anexo 2. Transcripción reversa para EM, PVN y AH.

Notas previas:

- a) Encender y programar el baño seco a 70°C para la desnaturalización del ARN y el baño con agitación a 37°C para la incubación del mismo. Previamente se deben monitorear por horas los baños para cerciorarse que la temperatura es constante.
- b) Calcular el número de μl equivalentes a 1 μg de ARN total en cada muestra, más un volumen adicional de H_2O DEPC suficiente para que las alícuotas tengan 12 μl como un volumen final. También se debe calcular el volumen del cocktail para a reacción equivalente al número de muestras más uno (para considerar error por pipeteo).
- c) Limpiar los guantes con alcohol y solución descontaminante.

Procedimiento:

1. Descongelar las muestras almacenadas en hielo (4°C) durante 5 minutos aproximadamente. Agitar las muestras en vórtex.
2. En caso de haber purificado y cuantificado el ARN en espectrofotómetro en un tiempo previo (días/semanas) desnaturalizar las muestras de ARN durante 5 min a 70°C y regresar al hielo para después darle un bajón con la centrifuga a 4°C.
3. Tomar un μg de ARN total y resuspender en 1 volumen final de 12 μl de agua DEPC durante 5 minutos adicionales a 70 °C.
4. Colocar el ARN denaturalizado sobre el hielo durante 5 minutos.
5. Añadir 20 μl de la mezcla de reacción descrita a continuación. El volumen final entre el ARN diluido y la mezcla de reacción debe ser igual a 32 μl .

Mezcla de reacción para 1 muestra (20µl):

- 8.9 µl de agua DEPC
- 6 µl de buffer de transcripción 5X
- 3 µl de DTT [100 mM]
- 0.6 µl de dNTP's (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) [10 mM]
- 1 µl de oligodeoxinucleótido de timinas (oligo dT, 0.5 µM)
- 0.5 µl de la enzima transcriptasa reversa (200 U/µl)

6. Incubar en baño con agua a 37 °C durante 2 horas y posteriormente almacenarla a -20°C.

Anexo 3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1. Descongelar lentamente en una bandeja con hielo el reactivo y alícuotas obtenidas por RT y almacenada a -20 ° C.
2. Realizar cálculos preliminares para elaborar un cocktail equivalente al número de muestras más un control positivo, 1 control negativo y 1 extra para evitar errores de pipeteo.
3. Añadir a cada tubo de PCR 23 µl de la mezcla de reacción descrita en el siguiente cuadro.

Mezcla de reacción para 1 muestra de 25 µl (23 µl de reacción + 2 µl de ADNc):

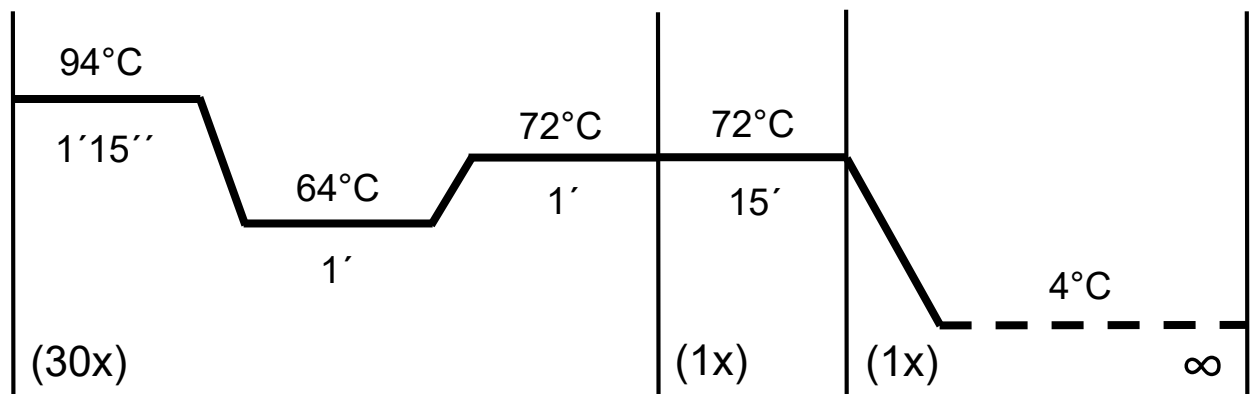
- 17.5 µl de H₂O ultra destilada.
- 2.5 µl para buffer Taq polimerasa 10x (adicionar mezclar)
- 1.25 µl de cloruro de magnesio 30 mM (adicionar y mezclar)
- 0.5 µl de dNTP'S 10 mM (mezcla A, C, G, T) (adicionar y mezclar)
- 0.5 µl oligonucleótidos sentido, concentración 25 pMol por µl (adicionar y mezclar)
- 0.5 µl oligonucleótidos antisentido 25 pMol por µl (adicionar y mezclar)
- 0.25 µl de Taq polimerasa (no agitar en vórtex, depositar en el fondo la enzima, a la mitad del tubo eppendorf. Se debe agitar suavemente la muestra con la pipeta y en las paredes hasta que no se vea glicerol).

4. Añadir 2 µl de ADNc del tejido procesado (EM, PVN o AH) (colocar en el fondo sin agitar). El volumen final entre el ADNc y la mezcla de reacción debe ser igual a 25 µl.
5. Programar la PCR según las condiciones de amplificación de cada gen y región (Ver condiciones de amplificación).
6. Guardar las muestras a 4 °C por un periodo no mayor a tres meses.

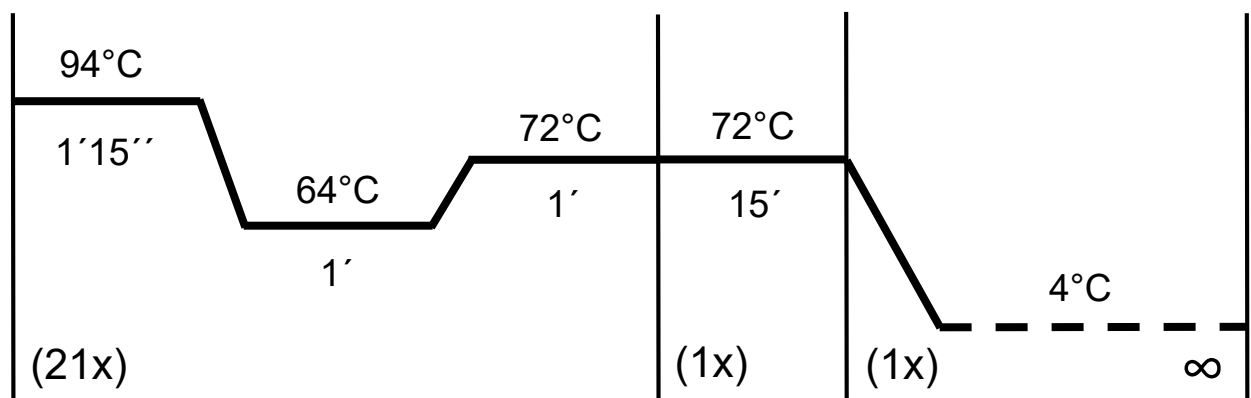
Condiciones de amplificación

La reacción en cadena de la polimerasa conlleva tres etapas (separadas por líneas verticales): amplificación, elongación final y conservación. La etapa de amplificación se divide a su vez en desnaturalización (aumento de temperatura), alineación (disminución de la temperatura) y elongación de la cadena (ligero aumento de temperatura). Las gráficas representan las condiciones de amplificación de los genes por la técnica PCR. Los valores en la parte superior e inferior de la gráfica representan respectivamente la temperatura y tiempo ((') minutos, ('') segundos) en que se debe programar el termociclador. Los valores entre paréntesis señalan el número de ciclos que deben realizarse.

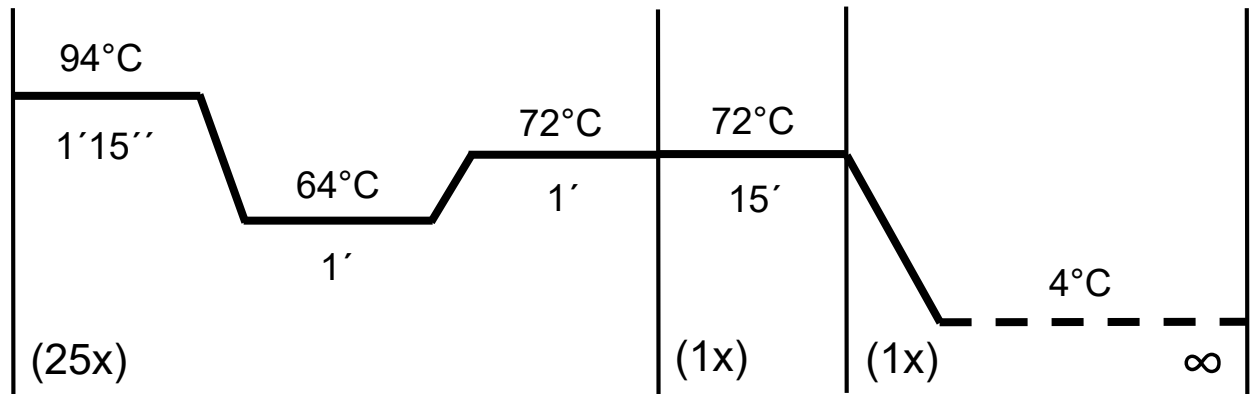
NPV. Gen ribosomal subunidad 18's.



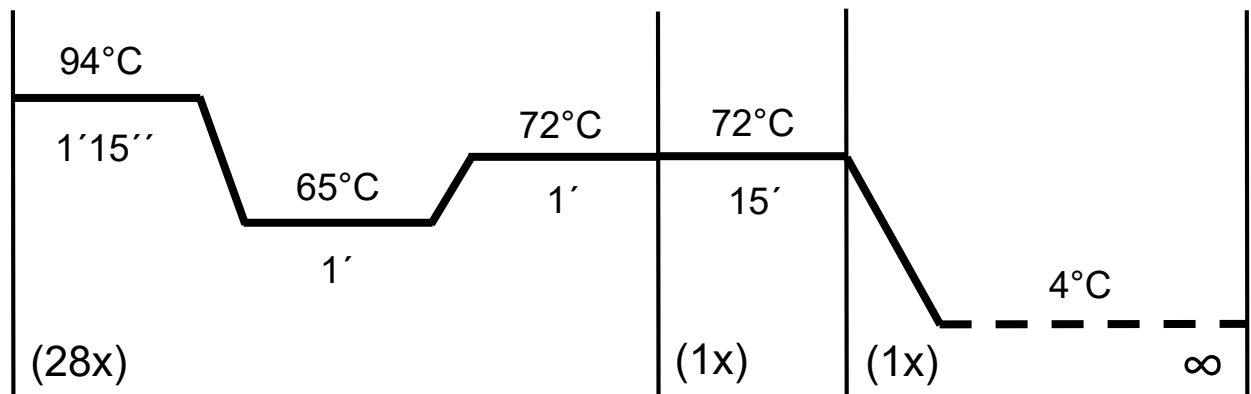
NPV. Gen ciclofilina



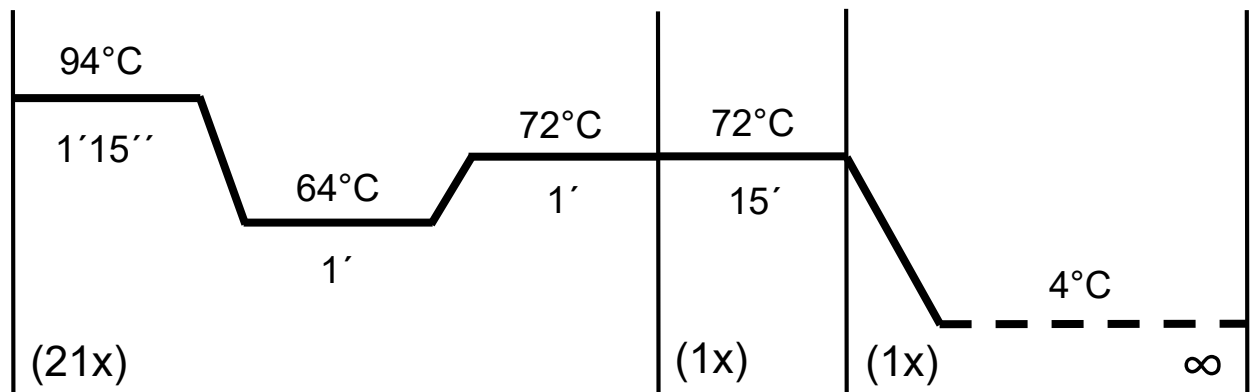
NPV. Gen TRH



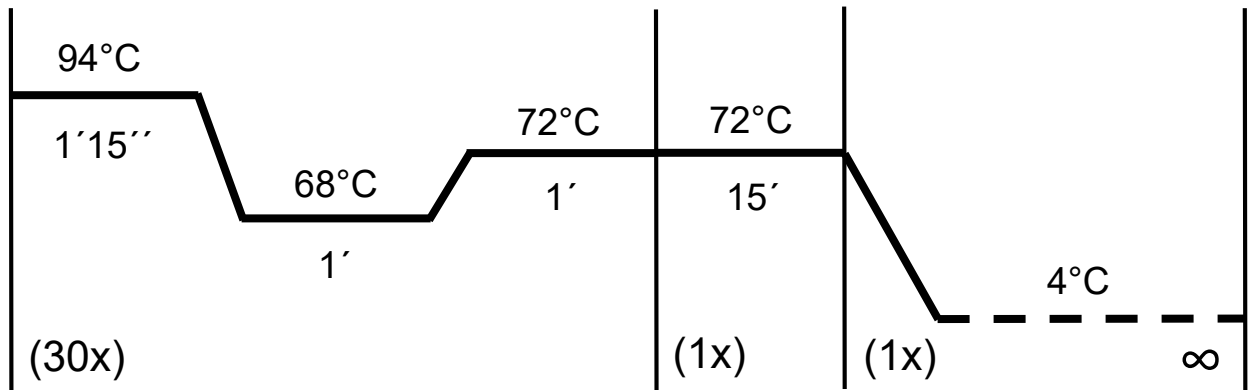
EM. Gen ribosomal subunidad 18's



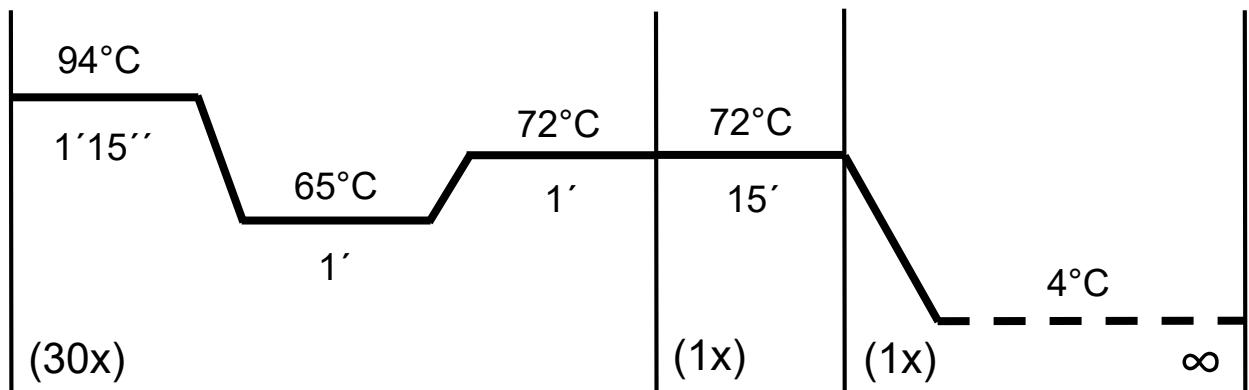
EM. Gen ciclofilina.



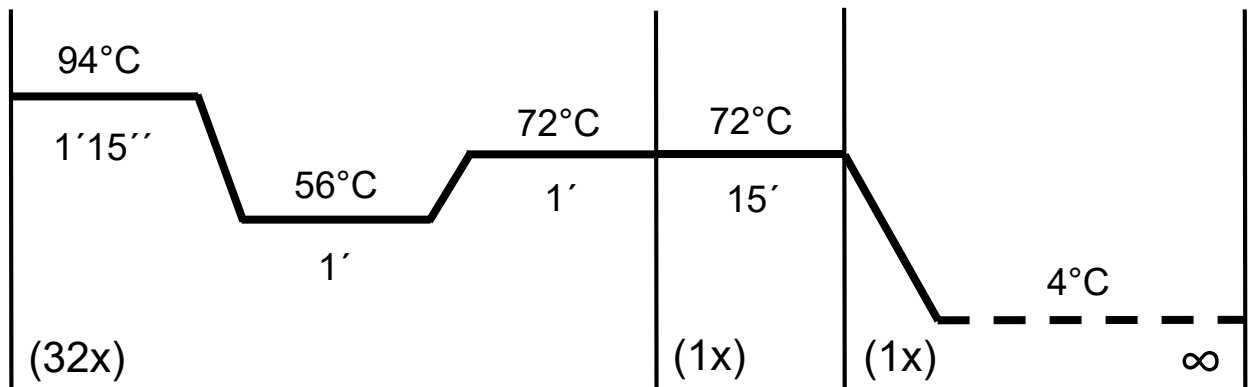
EM. Gen PPII



AH. Gen ribosomal 18's



AH. Gen PPII



Anexo 4. Actividad específica de PPII

- **Sonicación y centrifugación.**

Antes de empezar el procedimiento se debe limpiar el sonicador, primero con alcohol y luego con agua destilada, encender la centrifuga para que comience a enfriar y rotular los tubos.

1. Homogenizar las muestras almacenadas a -70°C mediante sonicación en $200\mu\text{l}$ de buffer fosfatos de sodio (50mM pH 7.5). Enjuagar el sonicador con el buffer al cambiar de grupo. A partir de este paso las muestras serán transportadas en hielo (no hielo seco).

2. Centrifugar las muestras a $12500g$ ó 8500rpm durante 40 minutos y retirar el sobrenadante.

3. Lavar el pellet con $200\mu\text{l}$ de buffer para finalmente resuspenderlo en $60\mu\text{l}$.

4. Sonicar una segunda vez durante tres segundos teniendo cuidado de no sacar el volumen de los tubos (enjuagar entre grupos).

5. Dar un bajón con la centrifuga durante 7 segundos.

6. Almacenar a -20°C hasta su procesamiento durante una noche. Si es mayor el periodo de tiempo se debe almacenar a -70°C .

7. Tomar $50\mu\text{l}$ para el ensayo de la actividad enzimática y el resto para la cuantificación de la proteína.

Medida de la actividad enzimática de PPII

1. Descongelar las muestras en hielo y rotular los tubos para 30, 60 y 180 minutos (se recomienda diferenciarlos con colores para evitar errores).

2. Preparar la mezcla requerida para determinar la actividad enzimática.

Mezcla de reacción para la actividad enzimática

- 27µl de buffer,
- 3.5µl de dipeptidil aminopeptidasa IV (DAP IV),
- 1.75µL de bacitracina (Sigma),
- 1.75µl de N-etilmaleimida (Sigma)
- 50µl de la muestra.

3. Incubar la mezcla durante 10 minutos a 37 °C.

4. Añadir 3.5µl del sustrato TRH-BNA (pGlu-His-ProBNA). Todos los reactivos y las muestras deben permanecer en hielo menos el sustrato.

5. Tomar alícuotas de 17.5µl a diferentes tiempos (30, 60 y 180 minutos) y añadirles 17.5µl de metanol frío al 50% en buffer fosfatos de sodio más 105 µl de buffer metanol para detener la reacción y así determinar la cinética de la misma.

6. Centrifugar a 12,000g por 3 minutos (para precipitar componentes que puedan interferir con la lectura de la fluorescencia).

Este procedimiento se basa en el hecho de que PPII hidroliza el enlace peptídico pGlu-His de TRH-βNA (pGlu-His-ProβNA) lo que genera el producto pGlu más el His-Pro-βNA. Posteriormente el enlace Pro-βNA del His-Pro-βNA es hidrolizado por la enzima DAP IV. Esta última hidrólisis genera los productos His-Pro más el fluoróforo libre (βNA) que puede ser detectado en el espectrofluorímetro. Debido a lo anterior se dice que este es un ensayo acoplado porque se requiere de un primer corte para después dejar al fluoroforo. Por su parte la bacitracina y la N-etilmaleimida son inhibidores de la enzima Prolin endopeptidasa y la enzima Piroglutamil peptidasa I respectivamente, enzimas citosólicas que pueden degradar al TRH in vitro (Kelly et al., 1999).

7. Las muestras obtenidas en el paso anterior fueron utilizadas para medir la fluorescencia en un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS 508 Shelton, con los parámetros: 370 nm de excitación y 440 nm de emisión. Para realizar las lecturas de fluorescencia es necesario preparar una curva estándar de concentraciones conocidas

de BNA para calibrar el espectrofluorómetro. Preparar el blanco con buffer fosfato y metanol en una relación 1:1 así como concentraciones de 50, 100 y 500 pmolas de BNA. De no leerse en ese momento se guardan las muestras a 4°C.

*Nota: si la muestra contiene menos de 50µl se ajusta el volumen del buffer para que el volumen final sea de 84µl más el sustrato 87.5µl.

Cuantificación total de proteína

La cuantificación total de proteína presente en las regiones procesadas se realizó siguiendo el método descrito por Bradford (1976). Esta técnica se basa en el uso de Bradford, un colorante que se pega a los anillos aromáticos de las proteínas (entre más proteína tiñe más azul).

1. Realizar una curva estándar con diluciones seriadas de albumina sérica bovina (BSA; Sigma, a partir de una solución stock de 0.2µg/µl) en buffer fosfatos 50mM pH7.5 más 200µl de Protein Assay; BioRad Labs (Brandford) y 700µl de agua destilada (tabla 2).
2. Adicionalmente preparar las mezclas obtenidas en las muestras experimentales con 4 µl de extracto del tejido procesado más 96µl de buffer fosfatos y como blanco 10µl de solución salina.
3. Añadir 200µl de reactivo de Brandford más 700µl de agua destilada.
4. Tanto las muestras experimentales como las mezclas para la curva estándar y el blanco se prepararon por duplicado, se agitaron en vórtex y se incubaron a temperatura ambiente por lo menos 5 minutos (no más de 30 minutos) previos a la lectura de su absorbancia a 595nm en un espectrofotómetro (Beckman DU-650).

Realizar la curva de BSA permite identificar la absorbancia bajo cierta concentración, al cuantificar la absorbancia de las muestras experimentales el espectrofotómetro extrapola este valor para saber la concentración de la muestra. Los valores de absorbancia no deben pasar de 1 para que sean válidos.

Curva de BSA

Albumina	μ l stock 0.2 mg/ml	Buffer fosfatos 50mM pH 7.5	H ₂ O destilada	Bradford reagent essay (Biorad)
0	0	100	700	200
0.5	2.5	97.5	700	200
1	5	95	700	200
2.5	10	90	700	200
4	20	80	700	200
6	30	70	700	200
8	40	60	700	200
10	50	50	700	200
12	60	40	700	200
14	70	30	700	200
16	80	20	700	200
18	90	10	700	200
20	100	0	700	200