



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“HIPOTIROXINEMIA MATERNA EN RATAS
SPRAGUE-DAWLEY:
SECUELAS EN LA SINAPSIS GLUTAMATÉRGICA DE LA
PROGENIE”**

ANGELA PÍA GIANINI RUBIO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: DR. ENZO BOSCO VIDAL

PROYECTO FONDECYT 1040349

SANTIAGO, CHILE

2006

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios y a la Virgen por ayudarme y cuidarme durante todo el camino que he recorrido para llegar hasta aquí...

Me gustaría no olvidar a nadie, por que para poder realizar este proyecto han pasado muchas cosas en mi vida, se cierra un ciclo que fue espectacular, tantas puertas abiertas y tantas puertas que he cerrado, más las cosas que he pasado las llevo conmigo por que me han formado como persona y me han hecho ser como soy, con virtudes y defectos, a veces adorable y a veces terrible.

Empezaré por agradecer a mi madre, por ser mi apoyo y guía todos los días que he vivido. A mi hermano, por ser un gran compañero y aliado de finanzas. A nupito, por enseñarme con su pacífica sabiduría, a amar a todos los animales que están en mi camino.

No puedo olvidar mencionar a Carmen y Anita, que me cocinaron muchas cosas ricas durante el desarrollo de este proyecto, gracias por hacer mi cama y por cuidar a mis niñas mientras yo trabajaba.

A Chola María y Lulito, gracias por comprender todas las noches en que llegaba a casa y no les hacía cariño, de hecho ni las miraba...

A mis amiguis Nora y Andreíta, por comprender que literalmente desaparecí y no nos podíamos juntar ni siquiera a copuchar, las quiero mucho.

A mi papi, por su ayuda y cariño, por darme dinero y pega extra para financiarme.

A mi profe, Claudia, por darme la oportunidad de trabajar en el proyecto y enseñarme a ser un “bioquímico” y apoyarme en eso.

No puedo olvidar a Mauricio, que con su santa paciencia me enseñó mi trabajo y a aprender a entretenerme en él, ¡Muchas Gracias, querido Maurice!

A don Jorge Sanhueza, por hacer agradable la terrible tarea de experimentar con ratitas.

Al laboratorio de neurociencias de la Universidad de los Andes, por ayudarme mucho, por hacer un ambiente cálido, a Sol, Dennisse, Rodrigo y dra. Ulita.

Una persona muy especial y que me ayudó enormemente por su paciencia y disposición a enseñarme técnicas de IHQ, es don Jorge Abarca, Muchas gracias.

A Alejandra Viedma, por escucharme y ayudarme en este trabajo y en los negocios, además de su hermosa compañía, por ser una linda persona, ¡Mucha suerte en Los Ángeles!

A Juan Pablo Pérez, el Director Sr. Veterinario, por enseñarme muchas cosas valiosas y darme consejos para seguir adelante y enfrentar el desafío de trabajar y terminar mi escrito, gracias patrañas !.

Continuando con la ayuda, en la Universidad Andrés Bello quiero agradecer a nuestro super JP por todas sus atenciones y paciencia con el odioso Team CR, a Juan Alberto por aguantar las tallas, a todo el laboratorio de Biología Celular y Farmacología en general, a Gino por ayudarme a tomar fotos con un foco decente...

Al team CR, con especial cariño a Cindita (Champion) y a Claudita (Gringa) por realmente hacerme agradable el trabajo, por aguantar el mal genio y por las conversas diarias, son geniales, por favor no cambien y que tengan mucha suerte en sus proyectos.

Al Dr. Bosco, por ser mi profesor guía en la facultad y por ceder parte de su tiempo en ayudarme, a la Dra. Anticevic, por su apoyo en los momentos difíciles durante la carrera, y a la Dra. Urquieta por sus excelentes consejos y correcciones, para hacer de la presente memoria un mejor trabajo.

Perdón ratitas y gracias por su ayuda, sin ustedes, esto no tendría resultados...

A todos ustedes y a los que pudiera olvidar, ¡¡MUCHAS GRACIAS!!

Angela Gianini Rubio

*“Hoy he alcanzado una linda meta,
he visto pasar a mucha gente en mi andar,
algunos que amo ya han partido,
pero junto a quienes quedan,
construiré mi huella,
ya al final cuando el camino acabe,
diré gracias a los que me amaron y me
permitieron alcanzar mis sueños”*



*A mi madre, por ser un apoyo y guía todos los días de mi vida...
A mi hermano, por ser un gran compañero,
A Juan Pérez, por su cariño,
Y a mi perrito nupito, por enseñarme con su tranquila sabiduría a
respetar a todos los animales que están en mi camino...*

RESUMEN

Las hormonas tiroideas T_3 y T_4 son fundamentales para el desarrollo del SNC del feto y del recién nacido. La hipotiroxinemia materna es una patología asintomática caracterizada por la reducción de los niveles plasmáticos de T_4 de la madre. Se ha demostrado en los humanos que cuando la hipotiroxinemia materna ocurre durante los primeros 5 meses de gestación conduce posteriormente a daño cognitivo irreversible en su hijo. Este daño es observado como déficit atencional hasta retardo mental severo. Existe abundante evidencia en la literatura que demuestra la participación de la neurotransmisión glutamatérgica y la acción de las neurotrofinas del telencéfalo en procesos que subyacen fenómenos cognitivos complejos, como son la memoria y el aprendizaje. Según estas evidencias se basó la hipótesis de mi memoria que propone que *la hipotiroxinemia materna durante el primer período de gestación, afecta la composición proteica de la densidad postsináptica (DPS) de las neuronas glutamatérgicas del telencéfalo de ratas Sprague-Dawley*. Por lo tanto, el objetivo general de la presente memoria fue estudiar la composición de las principales proteínas que forman parte de la DPS. La hipotiroxinemia materna se indujo a ratas preñadas, mediante la administración de Metimazol al 0,02% en el agua de beber durante los días E12-E15 de gestación. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas y TSH con la finalidad de corroborar que se indujo hipotiroxinemia. Los telencéfalos de las camadas obtenidas fueron analizados a los 2 meses de edad. Se procedió a analizar la expresión total y su presencia en la DPS de los receptores glutamatérgicos y de los receptores para las neurotrofinas. Los resultados obtenidos muestran que la hipotiroxinemia materna temprana aumenta en la descendencia la expresión del receptor tirosina kinasa B (TrkB) en el telencéfalo y el contenido de éste en el complejo de proteínas que conforma la DPS. Consecuente con este resultado se observó un aumento de neuronas

con migración aberrante en el hipocampo que marcaban positivo para TrkB. Además, se observó cambio significativo en la expresión total en el telencéfalo de la subunidad del receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA), NR1 y de la proteína estructural de la densidad postsináptica PSD95, sin observarse cambios significativos en el contenido de estas proteínas en la DPS. Todos estos resultados que fueron significativamente diferentes con respecto al control, fueron revertidos cuando a las ratas madres que se les indujo hipotiroxinemia recibieron una inyección de T₄. Nuestros resultados muestran que efectivamente la hipotiroxinemia que ocurre en el periodo de gestación afecta la expresión de proteínas importantes para la sinapsis glutamatérgica y afecta la composición de la DPS posteriormente en el estado adulto de la descendencia. Basados en el análisis de nuestros resultados podemos sugerir que el deterioro cognitivo observado en estos animales puede deberse en parte a la alteración de la expresión y/o composición de los receptores glutamatérgicos y neurotrofinas en el telencéfalo.

Palabras clave: Hormonas tiroideas, sinapsis glutamatérgica, neurotrofina, telencéfalo.

SUMMARY

Thyroid hormones are essential for the development of the central neuronal system (CNS) of the fetus and newborn. Maternal hypothyroxinemia is an asymptomatic pathology characterized for a reduction on plasmatic T_4 . It has been shown in humans that maternal hypothyroxinemia during the first five months of pregnancy induces irreversible cognitive damage to the newborn. The cognitive alteration can be observed from attention deficit to severe mental retardation. There are a number of evidences at the literature that show participation of the glutamatergic neurotransmission and neurotrophins on processes like memory and learning. Based on that, our working hypothesis proposes that “*the maternal hypothyroxinemia over the first trimester of gestation, affects the protein composition of glutamatergic postsynaptic densities (PSD) from the telencephalon of the Sprague-Dawley rat progeny*”. Therefore, the general aim of this memory was to study the composition of the main proteins that belong to the PSD. The maternal hypothyroxinemia was induced to pregnant rats by giving them 0.02% of methimazole in the drinking water during E12-E15 of gestation. After this treatment the plasma concentrations of thyroid hormones and TSH were analyzed with the goal to confirm that the rats became hypothyroxinemic. The telencephalons of the progeny were analyzed when the rats were two months-old. We proceeded to analyze the total expression and the content at the PSD of the glutamatergic receptors and neurotrophins receptors. Our results show that the early maternal hypothyroxinemia increases the total expression of tyrosine kinase B receptor (TrkB) in the telencephalon and its content at the PSD. Consequently, with this result we observed an increase in the amount of neurons with aberrant migration that stained positive for TrkB at the hippocampus. Furthermore, we observed a significant increase on the total expression of the subunits of *N*-methyl-*D*-aspartate acid (NMDA) receptor, NR1 and the structural protein of PSD, PSD 95 at the telencephalon, without a significant change of these proteins at the PSD. All these results that were significantly different from control rats were reverted by the MMI+ T_4 rats. Our results show that the hypothyroxinemia during the first gestational period affects to the adulthood specifically on the expression of proteins that are essential for glutamatergic synapsis and affects the composition of PSD. Based on our study we can suggest that the cognitive damage observed on these animals can be due in part to an alteration on the expression and/or composition of glutamatergic receptors and neurotrophins and their receptors at the plas.

Key words: Thyroid hormones, glutamatergic synapses, neurotrophins, telencephalon.



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



**“HIPOTIROXINEMIA MATERNA EN RATAS
SPRAGUE-DAWLEY:
SECUELAS EN LA SINAPSIS GLUTAMATÉRGICA DE LA
PROGENIE”**

ANGELA PÍA GIANINI RUBIO

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario.
Departamento de Ciencias Clínicas

NOTA FINAL: _____

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : ENZO BOSCO VIDAL	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: BESSIE URQUIETA	_____	_____
PROFESOR CONSEJERO: JOSÉ LUIS ARIAS	_____	_____

SANTIAGO, CHILE

2006

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
II.1. HORMONAS TIROIDEAS	2
II.2. HIPOTIROXINEMIA MATERNA	3
II.3. SINÁPSIS QUÍMICAS	5
II.4. MEMORIA Y RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS.....	6
II.5. NEUROTROFINAS	8
II.6. TRKB	9
II.7. LAS HORMONAS TIROIDEAS Y SU EFECTO SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN EXCITATORIA GLUTAMATÉRGICA.....	10
II.8. NEUROTROFINAS Y HORMONAS TIROIDEAS	11
II.9. ALGUNOS ASPECTOS DE LA ORGANIZACIÓN NEURONAL.....	11
II.9.1. <i>Hipocampo</i>	12
II.10. METIMAZOL (MMI) Y SUS EFECTOS EN LA SÍNTESIS DE HT	13
III. HIPÓTESIS DE TRABAJO	15
IV. OBJETIVOS	15
V. MATERIAL Y MÉTODO	16
V.1 MATERIAL.....	16
V.1.1. <i>Material biológico de experimentación</i>	16
V.1.2. <i>Anticuerpos</i>	16
V.2. MÉTODOS.....	17
V.2.1. <i>Modelo experimental: Ratas gestantes hipotiroxinémicas</i>	17
V.2.1. <i>Modelo 1</i>	17
V.2.1. <i>Modelo 2</i>	18
V.2.2. <i>Determinación de las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas y TSH</i>	20
V.2.3. <i>Preparación de densidades postsinápticas (DPSs)</i>	20
V.2.4. <i>Determinación de la Concentración de Proteínas</i>	22
V.2.5. <i>Inmunodetección</i>	23
V.2.6. <i>Inmunohistoquímica</i>	26
V.2.6.1. <i>Perfusión y fijación del tejido cerebral</i>	26
V.2.6. <i>Inmunohistoquímica contra TrkB</i>	28
V.2.6. <i>Detección de NeuN por Inmunohistoquímica</i>	29
V.2.7. <i>Análisis estadístico</i>	30
VI. RESULTADOS.....	30
VI.1. EVALUACIÓN DEL MODELO DE HIPOTIROXINEMIA MATERNA	30
VI.2. EFECTO LA HIPOTIROXINEMIA MATERNA SOBRE LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LOS HOMOGENIZADOS Y LAS DPSs DEL TELENÉFALO DE SU PROGENIE	34

VI.2.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y EXPRESIÓN DE TrkB EN EL TELENCEFALO ...	35
VI.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES NR1 Y NR2 A/B DEL RECEPTOR DE NMDA EN EL TELENCEFALO	36
VI.2.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y EXPRESIÓN DE PSD95 EN EL TELENCEFALO	38
VI.2.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y EXPRESIÓN DE P75 EN EL TELENCEFALO	39
VI.2.5. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO Y EXPRESIÓN DE Trk A EN EL TELENCEFALO .	40
VI.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE BDNF	44
VI.4. DISTRIBUCIÓN DE TrkB EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MMI	45
VI.5. DISTRIBUCIÓN DE NeuN EN EL HIPOCAMPO DE RATAS MMI	51
VII.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	54
VII.2. SEGUNDO MODELO EXPERIMENTAL Y EL EFECTO DE MMI EN LA PROGENIE	54
VII.3. EFECTO DE LA HIPOTIROXINEMIA EN LA COMPOSICIÓN DE LA DPS	55
VII.4. DAÑO COGNITIVO DE LAS RATAS MMI	56
VIII. CONCLUSIONES	59
VIII. BIBLIOGRAFÍA	60
IX. ANEXOS	67
IX.1. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD MOTORA, LOCOMOTORA Y DE MEMORIA VISUAL-ESPACIAL	67
IX.2. POTENCIACIÓN A LARGO PLAZO EN EL SEGUNDO MODELO EXPERIMENTAL	68
IX.3. EQUIPO UTILIZADO EN IHQ: BOMBA DE PERFUSIÓN	70
IX.4. SISTEMA DE INMUNODETECCIÓN PARA BDNF (PROMEGA).....	71
X.5. ESQUEMA DEL ATLAS DE PAXINOS Y WATSON UTILIZADO EN ESTE ESTUDIO	75

INDICE DE ILUSTRACIONES

Figura N° 1. Esquema del Eje Hipotálamo - Hipófisis (Pituitaria) - Tiroides	2
Figura N° 2. Esquema de la Sinapsis Química Excitatoria	6
Figura N° 3. Esquema de las NT y sus Ligandos	9
Figura N° 4. Esquema del Hipocampo en el Cerebro Humano	13
Figura N° 5. Diagrama del Procedimiento de Purificación de las DPS	22
Figura N° 6. Tinción de Coomassie para corrección de cargas	24
Figura N° 7. Esquema Demostrativo de Perfusión.....	27
Figura N° 8. Fotografía de cortes Coroneles de Cerebro Analizados por IHQ contra TrkB....	29
Figura N° 9. Concentraciones plasmáticas de T ₃ Total	33
Figura N° 10. Concentraciones plasmáticas de T ₄ Libre	33
Figura N° 11. Concentraciones plasmáticas de TSH.....	34
Figura N° 12. Efecto de la hipotiroxinemia sobre la expresión de TrkB en homogenizados y DPSs del telencéfalo de ratas.	36
Figura N° 13. Expresión de NR1 en homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.	37
Figura N° 14. Expresión de NR2 A/B en homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.	38
Figura N° 15. Expresión de PSD95 en homogenizado (H1) del telencéfalo de ratas.....	39
Figura N° 16. Expresión de P75 en homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.	40
Figura N° 17. Expresión de TrkA en Homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.	41
Figura N° 18. Comparación de los niveles de expresión y contenido de las distintas proteínas en el homogenizado y DPS de ratas MMI.	42
Figura N° 19. Comparación de los niveles de expresión y contenido de las distintas proteínas en el homogenizado y DPS de ratas MMI+T ₄	43
Figura N° 20. Contenido de BDNF en el telencéfalo de ratas experimentales.....	44
Figura N° 21. Localización del CA3 del Hipocampo y área de análisis.	45
Figura N° 22. Inmunohistoquímica de TrkB.	46
Figura N° 23. Cuantificación de la marcación para TrkB en el <i>Stratum oriens</i>	47
Figura N° 24. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo.	47
Figura N° 25. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo.	48
Figura N° 26. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo.	49
Figura N° 27. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo.	50
Figura N° 28. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo	51
Figura N° 29. Determinación de la localización de la marcación para NeuN en la región CA3 del hipocampo.....	52
Figura N° 30. Morris water maze.....	67
Figura N° 31.1 y 31.2. LTP	69
Figura N° 32. Dynamax RP-1. Peristaltic pump.....	70
Figura N° 33. Placa de Elisa.....	72
Figura N° 34. Curva de Absorbancia a 450 nm	74
Figura N° 35. Fotografía del plato 19. Atlas de Paxinos y Watson.....	75
Figura N° 36. Detalle de abreviaturas del plato 19.....	76

INDICE DE TABLAS

Tabla N° 1.A. Determinación de las concentraciones plasmáticas de T_3T y T_4L	31
Tabla N° 1.B. Determinación de las concentraciones plasmáticas de TSH.	32

I. INTRODUCCIÓN

Las hormonas tiroideas, tri-yodo-tironina (T_3) y tiroxina (T_4), cumplen un rol esencial en el desarrollo y maduración del sistema nervioso central (SNC) del feto y del recién nacido (Anderson *et al.*, 2000). El déficit materno de estas hormonas provoca daños neuronales irreversibles en el feto. La hipotiroxinemia materna, caracterizada por la reducción plasmática de T_4 y provocada principalmente por una dieta insuficiente en yodo (I), es una de las causas más frecuentes de retardo mental en el recién nacido (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). Entre las anomalías neurológicas que puede padecer el infante se incluyen sordera, defectos en el lenguaje, deficiencia mental y defectos motores (Delange, 2001).

En nuestro país y a nivel mundial, las mujeres embarazadas con hipotiroxinemia no son pesquisadas clínicamente debido a que ésta es asintomática para la madre, teniendo por consecuencia que se les consideran como pacientes normales o eutiroides. Además, como clínicamente no se ha reconocido la importancia de la T_4 para el desarrollo del SNC, no se exige la determinación de las hormonas tiroideas al comienzo del embarazo de cada mujer. Lamentablemente, esta situación ha generado a nivel mundial un mayor porcentaje de niños con daño cognitivo y es por ello que el presente trabajo va dirigido a sustentar con bases celulares y moleculares la importancia de la T_4 materna durante la gestación, para un adecuado desarrollo del SNC del recién nacido. En esta memoria se analizará las sinapsis glutamatérgicas del telencéfalo, dado que éstas son esenciales en los procesos de memoria y aprendizaje. Procesos altamente dañados en niños que nacieron de madres que sufrieron de hipotiroxinemia durante el embarazo. Específicamente, se analizará a nivel molecular algunos de los componentes de la neurona postsináptica, como es la densidad postsináptica (DPS). La DPS es un complejo de proteínas que traduce la señal portada por el neurotransmisor glutamato y está conformada por diversas moléculas como el receptor *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) y sus subunidades, la neurotrofina BDNF (factor neurotrófico derivado de cerebro) y su receptor TrkB (receptor de tirosina kinasa B).

Este estudio aborda la hipotiroxinemia materna a nivel celular y molecular. Por lo tanto, tiene gran relevancia a nivel clínico, ya que el conocimiento de los mecanismos celulares y moleculares que subyacen a estos fenómenos contribuiría con herramientas para la creación de nuevas estrategias terapéuticas.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. HORMONAS TIROIDEAS

Las hormonas tiroideas son fundamentales para el metabolismo intermediario de todas las células del cuerpo de los vertebrados; además de ser esenciales para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC), del músculo esquelético y de los pulmones (Anderson *et al.*, 2000). La ausencia de estas hormonas durante la gestación es causante de daño neuronal severo e irreversible (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). Las hormonas tiroideas biológicamente activas son T_3 (3, 5, 3'-L- tri-iodotironina) y T_4 (3, 5, 3' 5'-L-tetraiodo-tironina o tiroxina). La síntesis de T_3 y T_4 ocurre en la glándula tiroidea. Anatómicamente la tiroides está ubicada en la región cervical anterior a la laringe y consta de dos lóbulos unidos por un istmo.

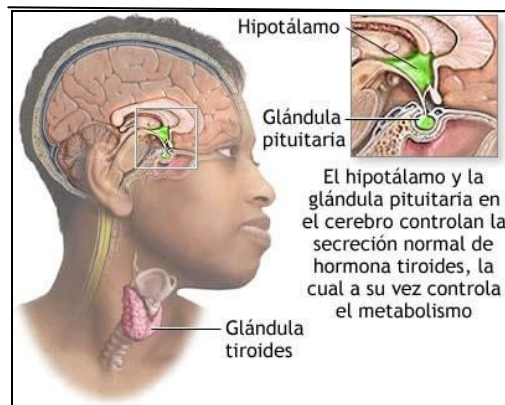


Figura N° 1. Esquema del Eje Hipotálamo - Hipófisis (Pituitaria) - Tiroides

Las flechas indican la localización de la tiroides, el hipotálamo y la glándula pituitaria en el ser humano (Hipotiroidismo, 2006).

La regulación de la síntesis de hormonas tiroideas es realizada por la hormona estimulante de la tiroides (TSH). La TSH consta de dos subunidades, la subunidad α y la subunidad β , las cuales son sintetizadas en la adenohipófisis (o glándula pituitaria anterior) y secretadas al flujo sanguíneo. La TSH mediante la interacción con su receptor (TSH-R) estimula la diferenciación, crecimiento y función de la glándula tiroidea. El mecanismo de acción de las hormonas tiroideas consiste principalmente en activar o suprimir la expresión de una amplia variedad de

genes. Esto se realiza mediante la unión a receptores nucleares específicos de alta afinidad (T_3 Rs) (Zhang y Lazar, 2000). Los T_3 Rs pertenecen a la misma clasificación que los receptores para hormonas esteroidales, vitamina D y ácido retinoico. Entre los receptores nucleares para T_3 se conocen dos tipos: $T_3R\alpha$ y $T_3R\beta$. Estos receptores se encuentran constitutivamente unidos a secuencias específicas de DNA, llamados elementos que responden a hormonas tiroideas (TREs). Una vez unida la T_3 a su receptor, éste sufre cambios conformacionales que le permiten liberarse o unirse a proteínas supresoras o activadoras de la transcripción. Así, a través de la activación o represión de la expresión génica es como las hormonas tiroideas regulan el funcionamiento celular (Zhang y Lazar, 2000). Estudios realizados en humanos, ratas y ovejas han demostrado la presencia de receptores nucleares para T_3 tanto en glías como en neuronas del SNC (Oppenheimer y Schwartz, 1997). En humanos se comienza a observar la expresión de T_3 Rs en el cerebro alrededor de la décima semana de gestación. En ratas esto ocurre pasado el día doce de gestación (Oppenheimer y Schwartz, 1997). La expresión de T_3 Rs en el cerebro es indicativo de la presencia y acción de las hormonas tiroideas en este órgano. Se debe destacar que la expresión de T_3 Rs en el cerebro fetal ocurre cronológicamente antes que la secreción de hormonas tiroideas por el mismo, lo que sugiere que los ligandos de estos receptores serían las hormonas tiroideas maternas que son transferidas al feto a través de la placenta.

II.2. HIPOTIROXINEMIA MATERNA

El déficit o la ausencia de las hormonas tiroideas maternas durante la gestación, provoca daños irreversibles al SNC. Esto se debe a que durante el primer semestre de gestación es la madre la que suministra al feto las hormonas tiroideas necesarias para el apropiado desarrollo de éste (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). Entre los fenotipos clínicos que presentan deficiencia de las hormonas tiroideas se encuentra el hipotiroidismo y la hipotiroxinemia. El hipotiroidismo se caracteriza por presentar los niveles de T_3 y T_4 bajo el rango normal y niveles más altos de TSH. La hipotiroxinemia, por otro lado, corresponde a una disminución sólo de los niveles de T_4 . En este último caso los pacientes son eutiroideos o normales y caen dentro de la clasificación de hipotiroidismo subclínico (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). Una de las causas más comunes de hipotiroidismo y de hipotiroxinemia es una dieta deficiente en I^- (yoduro) (Morreale de Escobar *et al.*, 2000).

El hipotiroidismo ocurre cuando existe una severa insuficiencia de I⁻ en la ingesta; en cambio la hipotiroxinemia es producida por deficiencias no tan severas de I⁻ en la dieta. A pesar que el hipotiroidismo genera un cuadro clínico más dramático que la hipotiroxinemia, en ambas circunstancias el cerebro del feto sufre alteraciones de gran magnitud (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). La razón yace en que aunque es la T₃ la que realiza el 80% de la actividad biológica de las hormonas tiroideas en el cerebro, solamente la T₄ es capaz de cruzar la barrera placentaria y la hematoencefálica (Oppenheimer y Schwartz, 1997). Una vez en el cerebro, la T₄ es deiodinada a T₃ por la acción de la deiodinasa 5'-iodotironina tipo II (Oppenheimer y Schwartz, 1997). De esta manera la T₄ provee al cerebro con el 85% de la T₃ que éste requiere para su desarrollo y funcionamiento. Por lo tanto, un cuadro hipotiroxinémico desabastece al cerebro también de T₃.

En el primer período de la gestación, la madre aporta el 100% de la T₄ al feto, ya que durante esta etapa el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides fetal se encuentra inmaduro, no pudiendo sintetizar sus propias hormonas tiroideas (Oppenheimer y Schwartz, 1997). En el segundo y tercer período de gestación, la madre suministra del 20% al 50% de la T₄ al cerebro fetal (Vulsma *et al.*, 1989). Estos porcentajes demuestran que durante todo el embarazo el aporte de hormonas tiroideas de la madre al hijo es de vital importancia para el desarrollo de su SNC. Una deficiencia de hormonas tiroideas durante el período prenatal va ligado a un severo y hasta ahora irreversible deterioro de las funciones cognitivas (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). Las cifras indican que una de las causas más frecuentes de daño neuronal en el recién nacido es por la hipotiroxinemia materna (Zoeller, 2003). Estudios clínicos recientes han demostrado que el daño cerebral causado por la hipotiroxinemia materna tiene una incidencia de 150 a 200 veces mayor a la producida por el hipotiroidismo congénito (Morreale de Escobar *et al.*, 2000). Los daños producidos a nivel de las funciones cerebrales son inversamente proporcionales a la cantidad de T₄ en la sangre y no al de T₃ ni TSH. A pesar de la relevancia que implica conocer en la madre los niveles de T₄ al comienzo del embarazo, en el presente, sólo se monitorean los niveles de hormonas tiroideas a mujeres gestantes conocidas clínicamente de padecer hipotiroidismo o hipertiroidismo (Glioner, 1998). Recientemente, estudios realizados en Holanda han demostrado que de cada dos mujeres con niveles bajos de T₄ en el primer trimestre del embarazo, una de ellas tiene hijos con índices intelectuales más bajo que el promedio (Pop *et al.*, 1999). Por lo tanto, la hipotiroxinemia materna es una condición preocupante que atenta contra la salud y calidad de vida de nuestra sociedad.

A pesar que clínicamente se reconoce que el hipotiroidismo congénito y la hipotiroxinemia materna son determinantes en la generación de daño neuronal irreversible en la progeñie, se conoce extremadamente poco acerca de los procesos celulares y moleculares que subyacen a estas patologías. Dilucidar estos mecanismos que están bajo el daño cognitivo contribuirá al mejor entendimiento del accionar de las hormonas tiroideas en el cerebro y también permitirá vislumbrar posibles alternativas terapéuticas que puedan disminuir o remediar el daño neurológico.

II.3. SINÁPSIS QUÍMICAS

Las neuronas conducen la información mediante la generación de potenciales de acción, los cuales viajan a través de la membrana plasmática de la neurona como impulsos eléctricos, que depolarizan la neurona. Los potenciales de acción, que alcanzan una amplitud máxima de unos 100 mV y duran 1 milisegundo (ms), en parte son resultado del desplazamiento de iones de sodio desde el fluido extracelular a través de la membrana celular hasta el citoplasma intracelular. La información que es conducida en una neurona como potencial de acción es transmitida a otra neurona mediante la sinapsis. La sinapsis puede ser química o eléctrica. La sinapsis química es la zona de contacto y comunicación entre un axón de una neurona y una dendrita de otra neurona. Esta comunicación esta mediada por transmisores químicos (o neurotransmisores) que son liberados por la neurona presináptica (figura 2). Cuando un potencial de acción llega al terminal presináptico produce un aumento de 1000 veces en la concentración de Ca^{+2} intracelular. Este aumento en el nivel de Ca^{+2} intracelular provoca la liberación de los neurotransmisores que se encuentran alojados dentro de diminutas vesículas al extracelular. El neurotransmisor una vez liberado cruza el espacio sináptico, que es una hendidura de unos 20 nanómetros de anchura que separa la membrana presináptica de la postsináptica. Una vez que el neurotransmisor llega al espacio sináptico interactúa con su receptor que se encuentra en la neurona postsináptica. Luego de la unión a su receptor, éste se activa y genera señales de traducción que abren o cierran determinados canales iónicos. Consecuentemente, se generan potenciales postsinápticos excitatorios o inhibitorios que modifican la excitabilidad de la membrana. Además, la activación del receptor puede generar señales que van al núcleo y regulan la expresión génica, es decir, que la neurona postsináptica transforma una señal química, dada por el neurotransmisor, en una señal eléctrica dada por el potencial de acción y en cambios en su expresión génica (Asociación Educar, 2005).

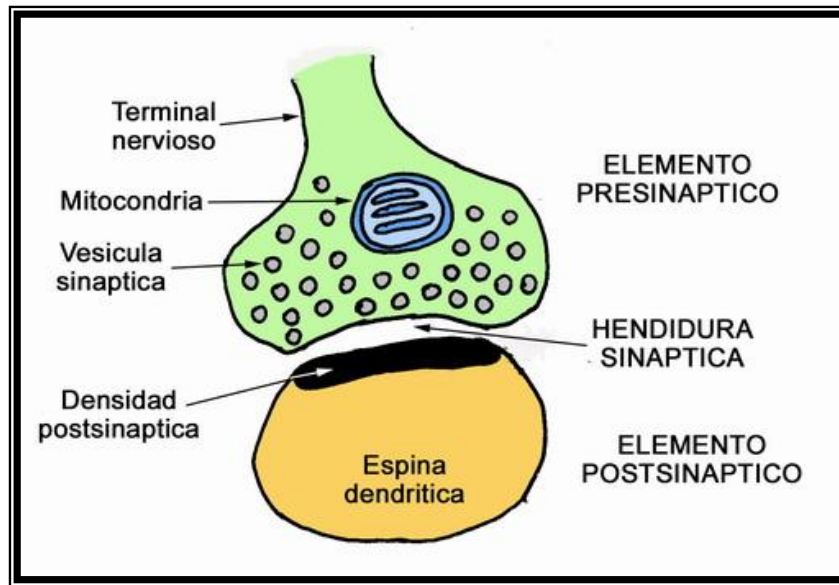


Figura N° 2. Esquema de la Sinapsis Química Excitatoria

La sinapsis excitatoria está constituida por el elemento presináptico, la hendidura sináptica y el elemento postsináptico. El elemento presináptico suele ser el terminal nervioso de la primera neurona, que contiene el neurotransmisor dentro de las vesículas sinápticas. El elemento postsináptico más común suele ser la espina dendrítica de la segunda neurona, en la que se puede distinguir la densidad postsináptica (DPS). Ambos elementos están separados por un espacio físico denominado hendidura sináptica. El neurotransmisor clásico de una sinapsis química excitatoria es el Glutamato. (Luján, 2004).

II.4. MEMORIA Y RECEPTORES GLUTAMATÉRGICOS

La memoria en general se almacena en la neocorteza y la adquisición de la memoria explícita depende del hipocampo (Bliss y Collingridge, 1993). En estas áreas, el almacenamiento de información estaría en parte mediado por cambios permanentes en la neurotransmisión excitatoria glutamatérgica. Esta última es mediada por los receptores de glutamato ionotrópicos (iGLuRs) y metabotrópicos (mGLuRs) los cuales juegan roles fundamentales en la plasticidad sináptica, desarrollo neuronal y desórdenes neurológicos. Ambos tipos de receptores se encuentran distribuidos en diferentes zonas del terminal pre y post sináptico,

para contribuir a la comunicación neuronal y al procesamiento de señales, que determinan el aprendizaje y la formación de la memoria (Riedel *et al.*, 2003). Los iGluRs participan directamente en procesos de memoria y aprendizaje (Bliss y Collingridge, 1993) y corresponden a canales iónicos gatillados por ligandos (Dingledine *et al.*, 1999). El rol fundamental de los iGluRs en el cerebro hace pensar que parte del deterioro de las funciones cognitivas observadas en los hijos de madres que sufrieron de hipotiroxinemia, se debe a alteraciones que ocurren en sus actividades. Estudios realizados en cerebros de ratas adultas y neonatas apoyan un rol regulador de las hormonas tiroideas sobre los iGluRs (Lee *et al.*, 2003). Por lo tanto, en esta memoria se propone que la hipotiroxinemia materna altera la expresión y localización subcelular de los iGluRs. Lo que fenotípicamente se traducirá en un número menor de sinapsis efectivas y, por lo tanto, en una menor capacidad intelectual.

Los iGluRs participan críticamente en procesos de memoria, aprendizaje, plasticidad sináptica y en fenómenos patológicos como la epilepsia. Los iGluRs que median estos procesos se ubican en las espinas dendríticas de la neurona postsináptica. Análisis de esta espina dendrítica por microscopía electrónica muestran un engrosamiento de la membrana llamado densidad postsináptica (DPS) (Kennedy, 1993). La DPS es un complejo proteico cuyos componentes moleculares son responsables de la transducción de la señal sináptica. Entre las proteínas que componen la DPS se encuentran los receptores iGluRs, los canales iónicos, las quinasas, las fosfatasas, las proteínas de anclaje y las de adhesión (Randall *et al.*, 2000). La unión del neurotransmisor a las DPSs genera un potencial excitador postsináptico que gatilla una variedad de eventos regulatorios los que en último término modifican la actividad cerebral.

Utilizando técnicas moleculares y criterios farmacológicos se han identificado tres familias de subunidades de iGluRs: los receptores AMPA (ácido *a*-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole propionato), que se activan por los coagonistas AMPA y por el ácido quisquálico; los receptores Kainatos que se activan por el ácido kaínico y el agonista selectivo ATPA (ácido 2-amino-3-hidroxi-5-ter-butylisoxazol-4-yl); y los NMDA (*N*-metil-*D*-aspartato) que se activan por los coagonistas NMDA y glicina. Además, las subunidades que conforman estos receptores han sido clonadas y se han identificado tres subunidades para los receptores tipo NMDA: NR1, NR2 A-D y NR3 A-B; cuatro para los receptores tipo AMPA: GLUR 1-4 y cinco subunidades para el receptor kaínico: GLUR5-7 y KA 1-2 (Dingledine *et al.*, 1999). Todos los integrantes de la familia de los receptores de NMDA han sido involucrados en mediar molecularmente procesos de memoria y aprendizaje (Riedel *et al.*, 2003).

II.5. NEUROTROFINAS

Las neurotrofinas (NT) son factores de crecimiento fundamentales para la diferenciación, reparación y supervivencia neuronal durante el desarrollo del SNC. Además, en el cerebro adulto participan en los procesos de plasticidad sináptica (Huang y Reichardt, 2001). La familia de las NT está compuesta por el factor de crecimiento neuronal (NGF); el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); la neurotrofina (NT) -3; la NT- 4 (o también conocida como NT-5); y la NT-6 (figura 3). Estas moléculas son glicoproteínas básicas que comparten entre un 50% a 60% de homología en su composición aminoacídica (Yan *et al.*, 1997). Las NT se localizan dentro de vesículas sinápticas, las cuales se acumulan en el terminal presináptico y son liberadas al espacio sináptico. Las acciones celulares de las NT son mediadas por dos tipos de familia de receptores. Un receptor de alta afinidad perteneciente a la familia de receptores tirosina kinasa (Trk) y por un receptor de baja afinidad que corresponde al receptor pan neurotrófico (P75) (figura 3) perteneciente a la familia de los factores de necrosis tumoral (Dechant, 2002). Tanto el terminal pre como el postsináptico contienen los receptores de alta afinidad para las NT. Estos receptores que pertenecen a la familia de los receptores de tirosina kinasa de transmembrana, son los llamados TrkA, TrkB y TrkC. Estos receptores Trk transmiten señales positivas, como aumento de la supervivencia neuronal y neurogénesis (Miller y Kaplan, 2001). NGF es el ligando de TrkA; BDNF y la NT-4/5 son los ligandos selectivos para TrkB; y la NT-3 se une primariamente a TrkC, aunque también puede interactuar menos específicamente con los otros tipos de receptores A ó B. El receptor utilizado por la NT-6 aún es desconocido (Yan *et al.*, 1997).

P75, es un receptor de baja afinidad para todas las NT mencionadas anteriormente (Yan *et al.*, 1997). Los receptores p75 transmiten señales tanto positivas como negativas. Estas últimas pueden llevar a la muerte celular o apoptosis, generalmente esto ocurre cuando los receptores Trk se encuentran inactivados o subactivados. Por otro lado, cuando los receptores Trk se encuentran activados, silencian la actividad proapoptótica de p75 (Miller y Kaplan, 2001).

II.6. TRKB

BDNF media su señal intracelular a través de la activación de TrkB. BDNF se une a los dominios extracelulares del TrkB e induce la dimerización del receptor y la subsecuente activación. TrkB, una vez que ha sido activado, se autofosforila en residuos de tirosina e interacciona con varias proteínas de señalización intracelular (Wu *et al.*, 1996).

Las tirosinas fosforiladas en el dominio citoplásmico de TrkB funcionan como sitios de anclaje a adaptadores intracelulares y a las proteínas efectoras, que inician diversas vías de transducción de señales. Estas señalizaciones, además de regular procesos inmediatos, producen efectos en la expresión génica de la célula (Haapasalo, 2003). Se ha propuesto que TrkB al interactuar con BDNF experimentaría una internalización a vesículas de tráfico intracelular que eventualmente llegarían al núcleo, donde se liberan moléculas de señalización que regularían la transcripción génica. Esta regulación génica afectaría positivamente el desarrollo y crecimiento dendrítico (Grimes y Miettinen, 2003). En diversos sistemas de estudio se ha visto que la activación de TrkB enciende al menos tres cascadas de transducción diferentes: la fosfatidil-inositol 3-Quinasa (PI3K), la fosfolipasa C γ y la vía de la MAPK (Huang y Reichardt, 2001). Evidencias en la literatura sugieren que las sinapsis glutamatérgicas se encuentran reguladas por la actividad de BDNF que es mediada por TrkB. La activación de TrkB puede tener efectos rápidos sobre la excitabilidad neuronal (Barde, 2002). BDNF ha mostrado ejercer efectos agudos sobre la transmisión sináptica glutamatérgica y GABAérgica. BDNF también ha mostrado jugar un rol importante en la plasticidad sináptica dependiente de actividad, incluyendo la potenciación a largo plazo (LTP) (Kolb *et al.*, 2005).

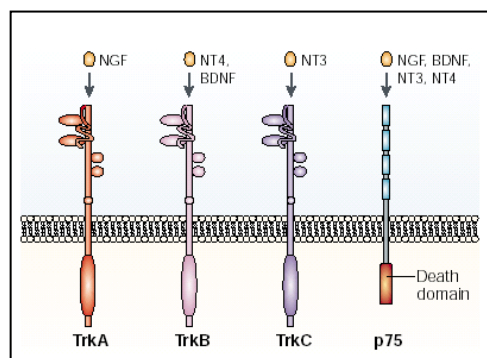


Figura N° 3. Esquema de las NT y sus Ligandos

En la figura se grafican los distintos receptores para NT y la afinidad de ellas a cada uno (sigma-aldrich, 2005).

Según estudios inmunohistoquímicos, el receptor TrkB se distribuye ampliamente en la membrana de neuronas piramidales, donde está presente tanto en los somas, terminales axónicos y dendritas, mientras que en neuronas no piramidales TrkB se distribuye principalmente en sus somas (Cellerino *et al.*, 1996). En el SNC se ha detectado expresión del mRNA de TrkB en el sistema olfatorio, corteza, hipocampo, tálamo, estriatum, amígdala y cerebelo (Yan *et al.*, 1997). La abundante expresión del mRNA de TrkB y BDNF en el cerebro es indicativo de la amplia población de neuronas que responden a BDNF. Experimentos de hibridación *in situ* y de Northern blot han revelado que el cerebro está altamente enriquecido con el mRNA que codifica para BDNF. Entre las regiones del cerebro que están enriquecidas con éste son el hipocampo, corteza cerebral y cerebelo. En hipocampo, por ejemplo, el mRNA de BDNF se localiza principalmente en neuronas piramidales y células granulares del giro dentado (Haapasalo, 2003).

“Splicing” alternativo del mRNA que codifica para TrkB resulta en tres diferentes isoformas truncadas del receptor, T1, T2 y T-sHc, y una isoforma, TK+ que contiene al receptor maduro. Mientras el TK+ maduro media los efectos biológicos conocidos de BDNF, el rol de los receptores truncados no está claro. Se ha propuesto que los receptores TrkB truncados modularían o inhibirían la señalización de TK+ después de la interacción con BDNF (Haapasalo, 2003).

II.7. LAS HORMONAS TIROIDEAS Y SU EFECTO SOBRE LA NEUROTRANSMISIÓN EXCITATORIA GLUTAMATÉRGICA

En el año 2003 se publicó el primer artículo sobre el daño neuronal en el cerebro de ratas recién nacidas debido a la hipotiroxinemia materna. Dicho estudio demuestra la presencia de aberraciones en la citoarquitectura neuronal de la corteza y del hipocampo (Lavado-Autric *et al.*, 2003). Estas aberraciones celulares corresponden en su mayoría a células heterotópicas, supuestamente excitatorias, las cuales también se han observado en otras enfermedades neurológicas como es el caso de la epilepsia (Battaglia *et al.*, 1996). Se piensa que el deterioro cognitivo observado en la progenie involucra también otros aspectos de las neuronas glutamatérgicas además de las aberraciones en su citoarquitectura. Además se cree que la actividad de estas células ectópicas altera la comunicación neuronal necesaria para los procesos de memoria y aprendizaje (Lavado-Autric *et al.*, 2003)

II.8. NEUROTROFINAS Y HORMONAS TIROIDEAS

Debido a que las NT actúan como reguladoras de procesos neuronales, participando en la sobrevivencia y diferenciación neuronal, se piensa que estas moléculas pueden ser mediadoras de la acción de las HT en el cerebro. Esta noción ha sido evaluada y demostrada en el cerebelo (Neveu y Arenas, 1996). Sin embargo, hay un número menor de estudios que apoyan la regulación de las NT por las HT en el hipocampo y corteza cerebral. Esto se debe a que el cerebelo es una estructura fácil de estudiar ya que contiene un número reducido de tipos celulares y una morfología más simple. Entre los estudios que soportan que las NT son reguladas por HT en el telencéfalo están:

1. Estudios realizados en ratas hipotiroideas en que se observó sobreexpresión del mRNA de TrkB en la corteza cerebral. La administración de HT a dichos animales reprimió la transcripción del mRNA de TrkB (Pombo *et al.*, 2000);
2. La administración crónica de T_3 a ratas recién nacidas, junto a una administración aguda de agonistas de los receptores serotoninérgicos, modifica los niveles de expresión del mRNA de BDNF en el hipocampo (Vaidya *et al.*, 2001).

Basados en estas evidencias y en el rol de las NT, pensamos que las HT en el SNC regularían la expresión y/o actividad de las NT y/o sus receptores en la corteza cerebral e hipocampo.

II.9. ALGUNOS ASPECTOS DE LA ORGANIZACIÓN NEURONAL

El SNC se desarrolla a partir del ectodermo embrionario, específicamente desde la placa o cresta neural (lámina plana de células) de la notocorda. En esas células del neuroepitelio ocurren divisiones celulares tanto simétricas como asimétricas, que dan origen a los neuroblastos. Luego los neuroblastos comienzan el proceso de migración celular. El fenómeno de la migración celular consiste en el movimiento de neuroblastos hacia la corteza, con la consiguiente formación de capas hacia la misma en la llamada migración radial y tangencial. Luego de terminado el proceso de migración celular, los neuroblastos se diferencian y dan origen a las neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y células ependimiales que forman el SNC de los mamíferos. Resumiendo, durante la neocorticoagénesis del embrión humano en el día embrionario número 26 se cierra el tubo neural y en el día 39 aparece el hipocampo; A partir del segundo al sexto mes de gestación ocurre migración celular a la corteza, y, desde el sexto al noveno mes de gestación comienza la maduración y organización cortical. En ratas la

neocorticogénesis corresponde entre los días 11 a 20 de gestación.

Las HT regulan precisamente las migraciones o posicionamiento celular en el SNC, tanto en la corteza y las conexiones corticales, como en el hipocampo. Alteraciones en la migración neuronal que ocurre prenatalmente provoca alteraciones en las migraciones postnatales. Por ejemplo, las migraciones talámicas, ya que al existir un desajuste en la organización cortical, los axones talámicos no llegan a la capa correspondiente (capa IV) (Cuevas *et al.*, 2005).

Se desconoce si aquéllas neuronas que migraron correctamente son funcionales y si aquellas que migraron incorrectamente forman parte de redes neuronales funcionales.

II.9.1. Hipocampo

El hipocampo es un área del cerebro localizada debajo de la corteza cerebral, en la superficie media del lóbulo temporal (figura 4). Forma parte del sistema límbico y juega un papel importante en la memoria. Le llega información del córtex o corteza y, a su vez, envía señales neuronales al hipotálamo y el área septal a través del fórnix. La principal función del hipocampo es la de la consolidación de la memoria y el aprendizaje. Estos procesos estarían mediados en parte por la neurotransmisión glutamatérgica. Por otro lado, existen evidencias que sugieren que las NT, particularmente las que realizan su acción sobre el receptor TrkB, modulan la plasticidad sináptica en el hipocampo. Primero, se señala que TrkB y sus ligandos BDNF, NT 4/5 y NT-3 se encuentran presentes en neuronas hipocampales. Segundo, la expresión de TrkB y de sus ligandos son modulados por la actividad neuronal. Tercero, la actividad de las neuronas hipocampales puede ser modulada por alteraciones en los niveles de NT (Drake *et al.*, 1999).

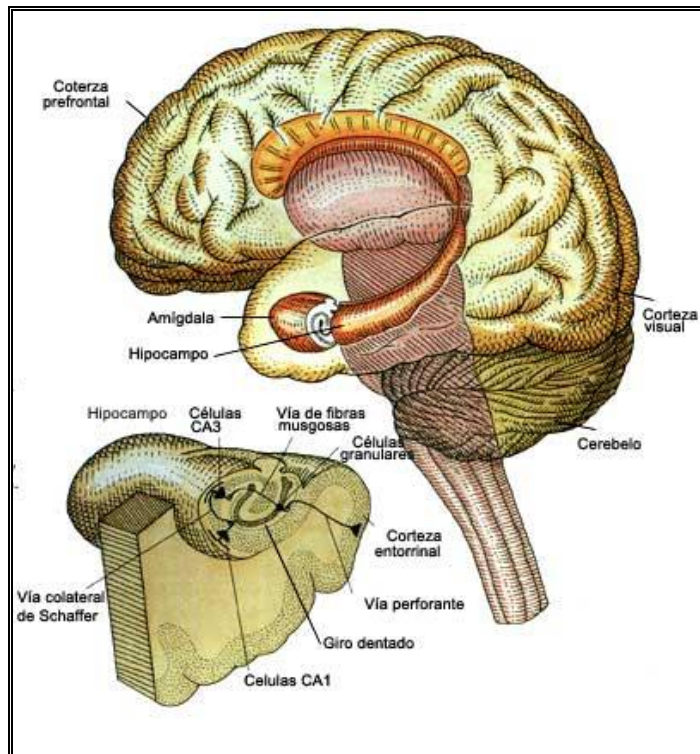


Figura N° 4. Esquema del Hipocampo en el Cerebro Humano

El hipocampo es una estructura importante para la formación de la memoria a largo plazo. Tiene el tamaño de un dedo pulgar de niño, y se encuentra localizado en la profundidad de la porción media del lóbulo temporal. La información fluye hacia y a lo largo del hipocampo por medio de tres vías principales que están indicadas en la imagen ampliada que se ve a la izquierda en la figura 4: 1. La vía perforante que circula desde la corteza entorrinal a las células granulares del giro dentado. 2. La vía de las fibras musgosas que va desde las células granulares del giro dentado a las piramidales de la región CA3 del hipocampo. 3. La vía colateral de Schaffer que proyecta desde las células de región CA3 a las de la región CA1 (Fundación Síndrome de Down, 2005).

II.10. METIMAZOL (MMI) Y SUS EFECTOS EN LA SÍNTESIS DE HT

El yoduro (I) es un constituyente esencial para la síntesis de las HT, T₃ (3,5,3'- L-tri-iodotironina) y T₄ (3,5',3-5'- L-tetraiodo-tironina), las únicas hormonas que contienen I en los vertebrados.

Dentro de las causas mencionadas que producen hipotiroxinemia están el consumo de una dieta escasa en yodo y algunos fármacos como son el metimazol (MMI), propiltiouracilo (PTU), fenobarbital y litio, entre otros, que ejercen su efecto en distintas etapas de la síntesis de HT.

El MMI específicamente actúa impidiendo la síntesis de HT en la glándula tiroídea, siendo un inhibidor específico de la enzima tiroperoxidasa o TPO, que se encuentra en la membrana apical de las células foliculares de la glándula y que es la responsable de catalizar la unión covalente de las moléculas de I oxidado a I² a los residuos tirosil de la tiroglobulina (tg), que es la molécula que finalmente dará origen a las HT. La hipotiroxinemia producida por MMI, se caracteriza por ser leve y transitoria, características importantes que imitan la situación observada en las mujeres embarazadas (Ausó *et al.*, 2004).

III. HIPÓTESIS DE TRABAJO

“La hipotiroxinemia materna durante el primer período de gestación, afecta la composición proteica de la DPS de las neuronas glutamatérgicas del teléncéfalo de ratas Sprague-Dawley.”

IV. OBJETIVOS

General:

Estudiar el efecto de la hipotiroxinemia materna sobre la composición de la DPS de la neurona glutamatérgica de la corteza cerebral e hipocampo en la progenie de ratas Sprague-Dawley.

Específicos:

1. Estudiar la expresión de los receptores glutamatérgicos NR1, NR2 A/B, mGluR, GluR1 y KA2, en la DPS del telencéfalo de ratas adultas que padecieron de hipotiroxinemia durante su gestación.
2. Estudiar la expresión de los receptores para neurotrofinas TrkA, TrkB y p75 en la DPS del telencéfalo de ratas adultas que padecieron de hipotiroxinemia durante su gestación.
3. Estudiar la expresión de BDNF en el telencéfalo de ratas adultas que padecieron de hipotiroxinemia durante su gestación.
4. Estudiar la distribución del receptor TrkB en el hipocampo de ratas adultas que padecieron de hipotiroxinemia durante su gestación.

V. MATERIAL Y MÉTODO

V.1 MATERIAL

V.1.1. Material biológico de experimentación

Los animales de experimentación usados fueron ratas macho adultas Sprague-Dawley con un peso aproximado de 250-300 gramos (60 días de vida).

V.1.2. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para Western blot fueron: anticuerpo policlonal contra la subunidad NR1, marca Chemicon (Número catálogo AB1516), usado a una dilución de 1/1000; anticuerpo policlonal contra la subunidad NR2A/B, Chemicon (Número de catálogo AB1548W), a una dilución de 1/2000; anticuerpo policlonal contra GluR1, Chemicon (Número de catálogo AB1504), a una dilución de 1/200; anticuerpo policlonal contra mGluR1, Transduction (Número de catálogo 610964), a una dilución de 1/2500; anticuerpo policlonal contra p75, Upstate (Número de catálogo 07-476), a una dilución de 1/1000; anticuerpo policlonal contra PSD-95, Transduction (Número de catálogo 610495), a una dilución de 1/250; anticuerpo policlonal contra TrkB, Transduction (Número de catálogo 610102), a una dilución de 1/1000; anticuerpo policlonal contra TrkA, Santa Cruz Biotechnology (Número de catálogo H-190), a una dilución de 1/200; anticuerpo policlonal contra KA2, Upstate (Número de catálogo 06-315), a una dilución de 1/2000. Los anticuerpos secundarios que se utilizaron fueron de ratón y conejo, Calbiochem (Números de catálogo 401215 y 401315, respectivamente), en concentraciones de 1/5000 y 1/10000. Los anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica fueron: anticuerpo primario policlonal anti-TrkB generado en conejo, Santa Cruz Biotechnology, Inc. (número de catálogo sc-12), a una concentración de 1/8000 y 1/4000; Anticuerpo secundario, policlonal, biotinilado anti-conejo obtenido en cabra, Laboratorios Vector (número de catálogo BA-1000), a una concentración de 1/1000; Anticuerpo monoclonal contra NeuN generado en ratón, Chemicon (Número de catálogo MAB377), a una concentración de 1/1000; anticuerpo secundario, policlonal, biotinilado anti-ratón, Laboratorios Vector (número de catálogo AP124B), a una concentración de 1/1000.

V.2. MÉTODOS

V.2.1. Modelo experimental: Ratas gestantes hipotiroxinémicas

Se evaluaron dos metodologías para inducir hipotiroxinemia a ratas gestantes. Ambas metodologías han sido previamente descritas en la literatura:

V.2.1.1. Modelo 1

Este modelo fue descrito por Lavado- Autic, *et al.*, en el año 2003. Con el objetivo de provocar hipotiroxinemia materna durante el primer período de gestación se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley, separadas en cuatro grupos experimentales. El primer grupo recibió una dieta baja en I⁻ más 0.005% de KClO₄ (perclorato de potasio, Sigma, Número de catálogo 241849). Se le adiciona KClO₄ con el objetivo de disminuir al máximo la posible captación de I⁻ por la glándula tiroidea, situación que pudiese ocurrir al existir trazas de I⁻ en la alimentación. A este grupo de animales se les denominó **ratas hipotiroxinémicas**; el segundo grupo experimental se alimentó con esta misma dieta baja en I⁻ más 10 µg de KI (yoduro de potasio, Sigma, Número de catálogo 221945), durante todos los días con la finalidad de que reciban una dieta normal en I⁻. A este grupo se le denominó como **control**; el tercer grupo experimental se alimentó con una dieta baja en I⁻ más la administración subcutánea de 3,6 µg de la hormona T₄ (Sigma, Número de catálogo T1775). A este grupo se le denominó **T₄** y se espera que la adición de T₄ revierta el fenotipo encontrado en el grupo de ratas hipotiroxinémicas. Se incluyó un cuarto grupo experimental, que son ratas que fueron alimentadas con la dieta básica de mantención para ratas de laboratorio elaborada por Champion S.A. La finalidad de este grupo fue para descartar algún problema de nutrición en el grupo control y experimental. De esta forma lo que se observe en el fenotipo experimental se deba a la falta de I⁻ y de T₄ y no a una posible desnutrición. Este cuarto grupo fue considerado como el “**control del control**”.

La dieta baja en yodo consistió en la elaboración de “pellets” húmedos con ingredientes de origen vegetal. Para 1 kilogramo de alimento se juntó: Harina de maíz (Maicena) 395 gramos (g), proteína de soya (Tagler) 200 g, carboxi metil celulosa 50 g, azúcar (Iansa) 100 g, dextrosa 132 g, aceite de soya 70 g, L- Cisteína (Calbiochem) 2,54 g, L-Metionina (Calbiochem) 2,54 g,

cloruro de colina (Sigma) 2,5 g, mezcla de vitaminas sin yodo (Dyets®, Inc.) 10 g, mezcla de minerales sin yodo (Dyets®, Inc.) 35 g y 700 ml de agua destilada (Sanderson) para mezclar. Después de un mes bajo este régimen alimentario se tomó una muestra de sangre venosa (extraída mediante corte de cola) y se analizó por quimioluminiscencia las concentraciones plasmáticas de T₃ y T₄ en el laboratorio del Instituto de Estudios Médicos Avanzados (IEMA). La TSH se analizó por radioinmunoensayo (RIA) en el laboratorio de la Dra. Doris Rosenthal de la Universidad Federal de Río de Janeiro, en Brasil. Las concentraciones hormonales se analizaron comparando dichos valores entre los animales experimentales y los controles. Una vez verificada la hipotiroxinemia murina, se procedió a seguir el ciclo sexual de las ratas, mediante detección de estro por medio de frotis vaginal. Detectado el estro, se juntaron las hembras con machos Sprague-Dawley normales para ser preñadas. Luego del proceso de cruce, las hembras siguieron bajo los mismos regímenes alimenticios y tratamientos durante toda la gestación (21 días). Una vez nacidas las camadas, éstas fueron sometidas a una dieta normal y se sacrificaron solamente los machos una vez alcanzada la vida adulta (60 días) para proceder con el análisis experimental.

V.2.1.2. Modelo 2

Este modelo fue descrito por Eva Ausó *et al.*, en el año 2004. Se utilizaron ratas preñadas Sprague-Dawley, separadas en tres grupos experimentales. Cada grupo estaba compuesto por 3 ratas. La cruce de las ratas se realizó en el servicio que otorga el vivero de la Pontificia Universidad Católica de Chile, a cargo del médico veterinario, Dra. Gabriela Méndez. La hipotiroxinemia materna se indujo a partir del décimo segundo día de gestación y durante cuatro días seguidos, es decir, entre los días 12 y 15 de gestación. Al primer grupo de animales se les administró la dieta básica de mantención, es decir, estos animales recibieron agua potable y dieta Champion. Este primer grupo correspondió al grupo **control**. Al segundo grupo se le administró agua potable y dieta (Champion) hasta el día decimoprimeros. A partir del décimo segundo día de preñez se les administró en el agua de beber metimazol (MMI) al 0,02% (Sigma, Número de catálogo M8506). Este segundo grupo correspondió a **ratas gestantes hipotiroxinémicas**. El tercer grupo de animales recibió el mismo tratamiento que el grupo 2 y, además, se les inyectó subcutáneamente 3,6 µg de T₄ a partir del doceavo día de gestación.

Este tercer grupo experimental fue diseñado con el fin de revertir el fenotipo experimental y se le denominó **MMI+T₄**. A los grupos control y ratas gestantes hipotiroxinémicas se les inyectó subcutáneamente una solución salina correspondiente a PBS 1X (NaH₂PO₄ 0,1 M, pH 7.4, Winkler).

Una vez terminado el tratamiento, se realizó un corte en la cola y se extrajo una muestra de sangre venosa (aproximadamente 200 µl). La sangre se recolectó en tubos con heparina. A partir de estas muestras se aisló el plasma mediante centrifugación a 2000 g por 10 minutos a una temperatura de 4°C, en una centrífuga Boeco, modelo U-32R. Luego, se analizó por quimioluminiscencia las concentraciones de T₃ y T₄ en el laboratorio del IEMA. La TSH se analizó por RIA en el laboratorio de la Dra. Doris Rosenthal. De esta manera se evaluó si la metodología aplicada genera hipotiroxinemia en la rata gestante. Las concentraciones hormonales de los animales experimentales fueron siempre analizados y comparados en relación al grupo de los animales controles.

Todas las ratas fueron alimentadas con una dieta tradicional que en este caso fue el “pellet” para ratas elaborado por el laboratorio de Champion S.A. Las ratas fueron mantenidas en el vivero central de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Se les controló los niveles de temperatura (23°C), ventilación y ciclos de luz / oscuridad de 14/10 horas en las salas donde se albergan los animales en experimentación.

Una vez nacidas las camadas y terminada la etapa de lactancia (30 días postnatales), se seleccionaron aquellas ratas de sexo masculino. Estos últimos fueron mantenidos a 23°C con ciclos luz / oscuridad de 14/10 horas, hasta los 60 días postnatales. Cumplida esta fecha, se procedió con la etapa de experimentación, para lo cual las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación con el uso de guillotina. Tanto el método de sacrificio y experimentación fueron aprobados por la Comisión de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

A las ratas hijas de madres control resultantes de este modelo experimental se les denominó control, a las hijas de madres hipotiroxinémicas se les denominó MMI y a las ratas hijas de madres control positivo se les denominó MMI+T₄ (igual que a las madres que les dieron origen).

La preparación de T₄, cuya dosis recomendada por la literatura es de 18 µg/kg diario, para el peso estimado de animales de 200 g, consistió en pesar 36 mg de T₄ (Sigma) y disolver en 1 ml de 4M NH₄OH, siendo esta la solución “stock 1”, de la cual se tomaron 10 µl (360 µg) que

se llevaron a 100 μ l de PBS 1X (Winkler), siendo esta preparación el “stock 2”. Del stock 2 se tomó 10 μ l (36 μ g) y se llevó a un volumen total de 2 ml de PBS 1X, de la cual se inyectaron 200 μ l por animal (cantidad de 3.6 μ g de T_4).

V.2.2. Determinación de las concentraciones plasmáticas de hormonas tiroideas y TSH

Las concentraciones de T_3 Total y T_4 Libre del plasma de ratas control, MMI y MMI+ T_4 se determinaron por la técnica de quimioluminiscencia realizada en el IEMA. Las concentraciones de TSH se determinaron mediante la técnica de RIA en el laboratorio de la Dra. Doris Rosenthal, de la Universidad Federal de Río de Janeiro, en Brasil. Esta técnica se ha utilizado exitosamente en investigación ya que permite medir en pequeños volúmenes de plasma bajas concentraciones de hormonas (del orden femtomolar, fM). Básicamente esta técnica consiste en el análisis de volúmenes pequeños de plasma de alrededor de 100 μ L. Estos se incuban con el anticuerpo específico para la hormona y luego se agregan trazas de TSH marcada con 125 I (~3000 Ci/mmol). La hormona unida al anticuerpo se precipita con una solución que contiene 30% de polietilenglicol. Las muestras son centrifugadas y se analiza la radioactividad incorporada en el precipitado que se obtiene con un contador gamma. De esta manera, se determina la unión de la hormona radioactiva al anticuerpo. Una mayor unión de radioactividad en el precipitado es un indicador de que las concentraciones plasmáticas de TSH están bajas.

V.2.3. Preparación de densidades postsinápticas (DPSs)

Las DPSs se aislaron siguiendo el procedimiento de Carlin y cols. (1980), modificado por Wyneken y cols. (2001) (figura 5). Para ello se utilizaron ratas macho Sprague-Dawley. Brevemente, las ratas fueron decapitadas utilizando una guillotina, para luego proceder a la extracción del cerebro (procedimiento aprobado por la Comisión de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile). Se aisló el telencéfalo, que principalmente corresponde a corteza cerebral e hipocampo. Por cada grupo experimental se obtuvieron aproximadamente seis telencéfalos de ratas y se colocaron inmediatamente en 6 ml de tampón de homogenización por gramo de tejido húmedo (gth). El tampón de homogenización correspondió a una solución de sacarosa (Winkler) 0,32 M, EGTA (Sigma) 0,5 mM, Tris-Cl (Sigma) 5 mM pH 7,4. Toda la preparación se realizó en frío, entre 0 y

4°C, utilizando contenedores con hielo. Los telencéfalos se picaron con tijeras de acero inoxidable y se homogenizaron con ocho golpes en un homogenizador de vidrio-teflón de 40 mililitros (ml) de capacidad (Thomas Scientific). De esta fracción (H1) se guardó una alícuota de 500 microlitros (µl) para su posterior análisis. El homogenizado se centrifugó en una centrífuga preparativa marca Sorvall®, modelo RC 5B plus, a 1.000 x g por 10 minutos, se guardó el sobrenadante (S1) y se lavó el sedimento (P1) en tampón de homogenización, el cual se volvió a centrifugar a 1.000 x g por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes (S₁) y se centrifugaron a 12.000 x g por 20 minutos. La porción sedimentada (P2) se resuspendió en un volumen final de 1 ml por gth. La solución de resuspensión, tampón de carga de gradientes, estaba compuesto por sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Se homogenizó con homogenizador vidrio-teflón de 20 ml de capacidad, y se cargó sobre una gradiente discontinua de sacarosa 1,0 M/1,2 M que consistía en Tris-Cl 5 mM pH 8,1 (4 ml por fase), con el fin de separar el material por flotación y sedimentación en una gradiente de densidad. Esta gradiente se centrifugó a 250.000 x g por 65 minutos en una ultra centrífuga (marca Beckman). Después de la centrifugación se descartó el sedimento y la interfase 0,32/1 M de sacarosa, compuestos principalmente por mitocondrias y mielina, respectivamente. Se colectó la interfase 1,0/1,2 M sacarosa, que contiene a los botones sinaptosomales y que corresponde al terminal pre y postsináptico resellado (Sinaptosomas 1). Posteriormente, los Sinaptosomas 1 se sometieron a un shock hipo-osmótico, agregando a la interfase colectada 10 volúmenes de EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1 (tampón de lisis), e incubándola durante 30 minutos a 0°C (en hielo) con agitación suave. Posteriormente el material se centrifugó a 33.000 x g por 30 minutos, y el precipitado resultante (P3) se resuspendió nuevamente en un volumen final de tampón de carga de gradientes que consistía en 1 ml/gth de sacarosa 0,32 M, EGTA 0,5 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Se homogenizó en un homogenizador vidrio-teflón de 20 ml de capacidad, y se cargó sobre una gradiente de sacarosa discontinua idéntica a la anterior. Se centrifugó a 250.000 x g por 65 minutos para luego recuperar el material presente en la interfase 1,0-1,2 M, que corresponde a membranas sinápticas reselladas (Sinaptosomas 2). Estos se someten a delipidación diluyendo la fracción hasta 6 ml/gth en tampón de delipidación, el que consistía en sacarosa 0,32 M, Tris-Cl 5 mM pH 8,1, para luego agregar un volumen igual de tampón de relleno que consistía en sacarosa 0,32 M, CaCl₂ 0,025 mM, Tritón X-100^{M.R.} 1%, DTT 2 mM, Tris-Cl 5 mM pH 8,1. Después de centrifugar a 33.000 x g por 30 min, el sedimento se lavó con HEPES-Na 50 mM pH 7,4 y se centrifugó a 250.000 x g por 10

min. El sedimento final (DPSs) se resuspendió en 0,2 ml/gth de Hepes 50 mM pH 7,4 y se homogenizó en un homogenizador vidrio-teflón de 1 ml de capacidad. El material se alicuotó en fracciones de 100 μ l y se congeló rápidamente en un baño de nitrógeno líquido (-196°C). Posterior a este procedimiento, las DPSs se almacenaron en congelación a -70°C hasta su uso en la inmunodetección (Western blot).

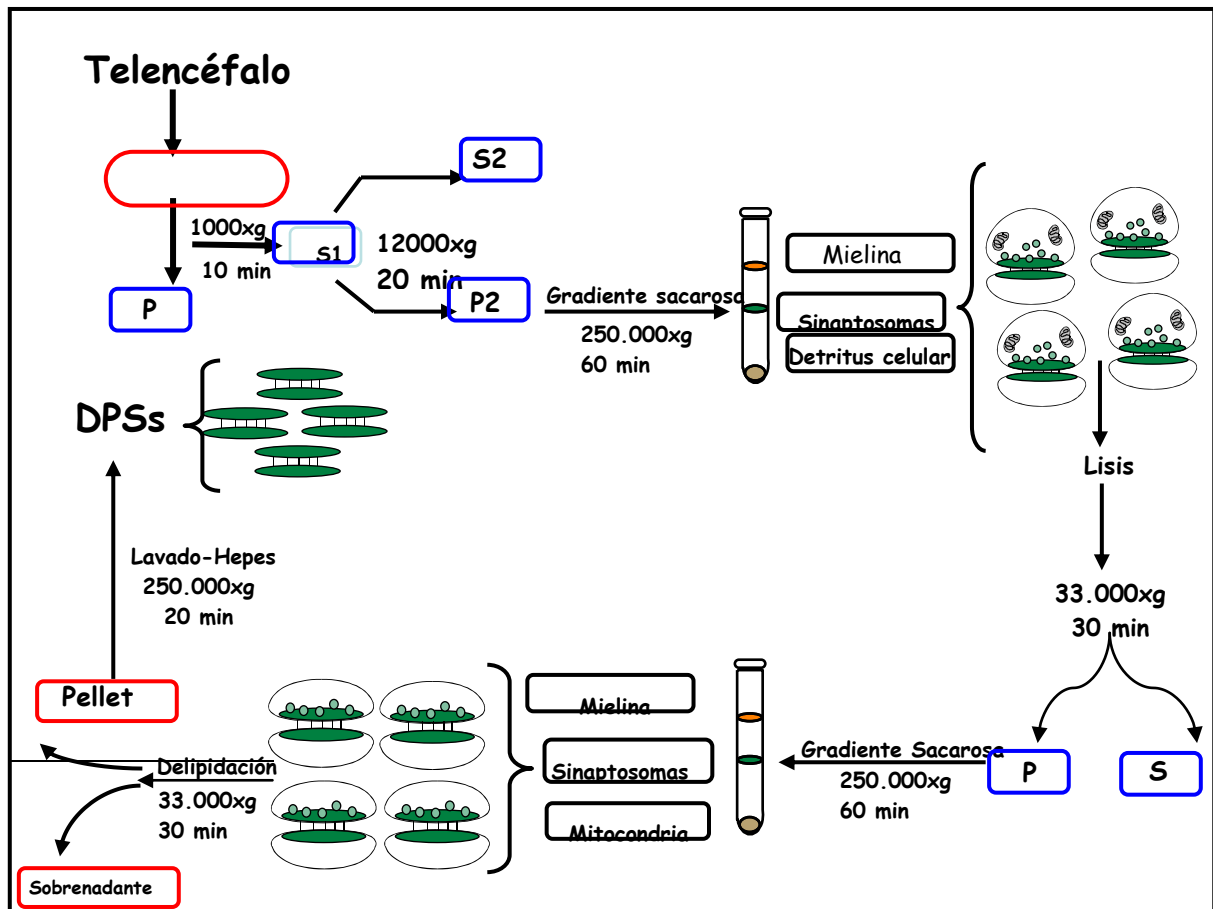


Figura N° 5. Diagrama del Procedimiento de Purificación de las DPS

V.2.4. Determinación de la Concentración de Proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método del ácido bicinónico (ver bibliografía: BCA, Sigma-Aldrich) (Smith y cols, 1985). El principio del análisis se basó en la formación de un complejo de Cu^{2+} con la proteína. Esto se realizó bajo condiciones alcalinas, seguida por la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . La cantidad de cobre reducido es proporcional a la

proteína presente. El BCA es una sal de sodio estable, hidrosoluble que forma un complejo púrpura-azul con el Cu^{2+} en ambientes alcalinos. De esta manera la reacción con BCA permite visualizar la reducción del Cu^{2+} a Cu^{1+} . El color producido de esta reacción es proporcional a la concentración de Cu^{1+} y, por ende, a la de la proteína. La lectura de absorbancia se realizó usando un filtro de 562 nm de longitud de onda. El análisis de BCA tiene varias ventajas que son apropiadas para nuestro estudio, como son:

1. El complejo de color es estable.
2. Hay menor susceptibilidad a los detergentes.
3. Es aplicable sobre una amplia gama de concentraciones de proteína.

Se utilizó seroalbúmina de bovino (BSA, Rockland) como estándar para la curva de calibración y la reacción fue analizada en el lector de Elisa EL_x 800, Bio-Tek instruments (Bioschile).

V.2.5. Inmunodetección

Se resuspendieron 20 μg de proteínas de membrana aisladas (DPSs) y 40 μg del homogenizado total de telencéfalo (H1) de cada grupo experimental ($n=3$) en tampón de carga a una concentración de 2X, compuesto por 100 mM de Tris HCl, pH 6,8; 4% p.v (peso/volumen) de SDS (Merck); 0,2% p.v. de azul de Bromofenol (Winkler); 20% v.v. (volumen/volumen) de glicerol (Merck) y 200 mM de β - mercaptoetanol (Winkler).

Se utiliza un estándar de peso molecular (Biolabs) de los pesos 175, 83, 62,47.5, 32 y 16 Kdá en una cantidad preestablecida por el laboratorio fabricante de 10 μl , por el cual se comparó los pesos moleculares de las distintas proteínas en estudio. Luego, las proteínas cargadas se sometieron a separación electroforética en geles denaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (Laemmli, 1970). La cantidad de proteínas a analizar en cada carril se corrigieron mediante densitometría óptica de las proteínas totales cargadas. Para ello se corrió en paralelo otro gel, el cual fue teñido con tinción de azul de Coomassie (Biosonda) (figura 6). Este gel se teñió y luego se destiñó para retirar el colorante adherido inespecíficamente en el gel, con una solución de 90 ml de metanol (Winkler) más agua en una proporción de 1:1 (45 ml de cada uno) y 10 ml de ácido acético glacial (HAC, Winkler), quedando teñidas sólo aquellas zonas correspondientes a las proteínas (bandas). Una vez que las bandas de proteínas fueron visualizadas, se cuantificaron por densitometría óptica (Laemmli, 1970). Para ello, se utilizó el procedimiento modificado por Wyneken y cols. (2001), el cual incorpora un sistema

computacional al análisis densitométrico de las bandas en estudio, en donde se colocó el gel ya desteñido sobre la placa de un scanner (Snap Scan 1212, AGFA), se escanea la totalidad del gel. Una vez que se obtuvo la imagen del gel escaneado, se utilizó el programa computacional Adobe Photoshop, donde se procedió a cuantificar la intensidad de las bandas, mediante píxeles.

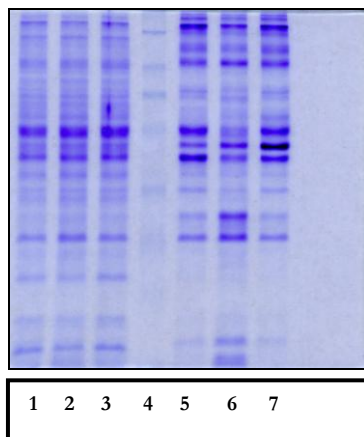


Figura N° 6. Tinción de Coomassie para corrección de cargas

Se muestra una fotografía representativa de un gel denaturante de poliacrilamida al 10% por el cual se separaron proteínas provenientes del homogenizado total del telencéfalo (Líneas de izquierda a derecha con los números 1, 2 y 3) y las DPS (Líneas 5, 6 y 7). La línea 4 corresponde al estándar de pesos moleculares (PM). Una vez terminada la electroforesis, el gel fue teñido con azul de Coomassie. Se cargaron 20 µg de proteína por carril. Las líneas 1 y 5 corresponden a muestras control; las líneas 2 y 6 corresponden a ratas MMI y las líneas 3 y 7 a MMI+T₄.

Luego de corregidas las cargas, se realizó otra electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. Las proteínas se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa (Biosonda), posteriormente fueron bloqueadas en leche descremada (Svelty, Nestlé) al 5% disuelta en PBS 1X (Winkler) + 1% Tween (Sigma) (similar al suero fisiológico, con pH 7,4) por una hora, en agitación y a temperatura ambiente. Después del bloqueo, se realizaron 3 lavados, de 10 minutos cada vez, con PBS 1X + Tween al 1%. Luego, las membranas de nitrocelulosa se sometieron a incubación con los respectivos anticuerpos primarios de conejo o de ratón.

La inmunodetección de NR1, se realizó utilizando un anticuerpo contra NR1 a una concentración de 1/1000, con un tiempo de incubación de 1 hora en agitación a temperatura ambiente y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La

inmunodetección de NR2 A/B, se realizó utilizando un anticuerpo contra NR2A/B, a una concentración de 1/2000, con un tiempo de incubación de 90 minutos en agitación a temperatura ambiente y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de GluR1, se realizó utilizando un anticuerpo contra GluR1, a una concentración de 1/200, con un tiempo de incubación de toda la noche en agitación a 4°C y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de mGluR1, se realizó utilizando un anticuerpo contra mGluR1, a una concentración de 1/2500, con un tiempo de incubación de 1 hora en agitación a temperatura ambiente y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de P75, se realizó utilizando un anticuerpo contra P75, a una concentración de 1/1000, con un tiempo de incubación de 1 hora en agitación a temperatura ambiente y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de PSD-95, se realizó utilizando un anticuerpo contra PSD-95, a una concentración de 1/250, con un tiempo de incubación de 1 hora en agitación a temperatura ambiente y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de TrkB, se realizó utilizando un anticuerpo contra TrkB, a una concentración de 1/1000, con un tiempo de incubación de toda la noche en agitación a 4°C y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de TrkA, se realizó utilizando un anticuerpo contra TrkA, a una concentración de 1/200, con un tiempo de incubación de toda la noche en agitación a 4°C y preparado en una solución de PBS 1X+Azida de sodio 0,001%; La inmunodetección de α KA2, se realizó utilizando un anticuerpo contra α KA2, a una concentración de 1/2000, con un tiempo de incubación de toda la noche en agitación a 4°C y preparado en una solución de PBS 1X más leche descremada (Svelty) al 3%.

Luego de las respectivas incubaciones con el anticuerpo primario, se procedió a tres lavados de la membrana, de 10 minutos (min) cada vez con una solución de PBS 1X + Tween al 1%. Después se procedió a incubar con el anticuerpo secundario, ya sea de ratón o conejo, en agitación y a temperatura ambiente por 1 hora. Los anticuerpos secundarios de ratón o conejo van acoplados a la enzima peroxidasa de rabanito. Las concentraciones utilizadas de dichos anticuerpos correspondían a las señaladas en las respectivas hojas de datos informadas por las

compañías de facturación. Ya incubada con el anticuerpo secundario, se procedió a realizar dos lavados, de 10 min cada vez, con una solución de PBS 1X + Tween al 1% y un lavado de 10 min con PBS 1X. La presencia de marca (inmunoreactividad) fue revelada o visualizada por la técnica de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Bioscience). La intensidad de las bandas en estudios se analizó computacionalmente por densitometría óptica. La prueba estadística que se utilizó es un Test de Student de dos colas, con una distribución normal de las muestras.

V.2.6. Inmunohistoquímica

V.2.6.1. Perfusión y fijación del tejido cerebral

El procedimiento de fijación del cerebro se basó en un protocolo modificado según Ichitani y cols. (1991). Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con una solución de ketamina (Ketamil, Agrovit, 100 mg/ml)/xilazina al 2% (Agroland) en una dosis para un animal de 250 g de 12,5 mg de Ketamina y 2,5 mg de xilazina, en forma intraperitoneal. Una vez anestesiado el animal se realizó un corte en piel, cercano al apéndice xifoides, con el fin de acceder rápidamente a la zona cardíaca. Se rompe el diafragma y se aproxima al corazón donde se realizó una incisión en el ventrículo izquierdo y se instaló la cánula de perfusión (figura 7). Luego de poner la cánula, se procedió a hacer funcionar la bomba de perfusión, Dynamax RP-1 (ver anexos). Para permitir el flujo sistémico de una solución de NaCl 0,9% (300 ml), se perforó la aurícula derecha para permitir la salida de sangre. Una vez desangrado al animal, se procedió a sustituir la solución salina por la solución fijadora (la solución fijadora consistió en 300 ml de paraformaldehído al 4% (Merck), ácido pícrico 0,3% (Sigma) y glutaraldehído 0,1% (Sigma) en tampón fosfato PBS 1X (NaH_2PO_4 0,1M, pH 7,4, Winkler)) a una velocidad de 50 RPM. Terminado este proceso, las ratas fueron decapitadas y el cerebro fue removido cuidadosamente. El cerebro se dejó por 24 horas en solución de fijación a 4 °C. Luego se procedió a deshidratarlo, para ello se dejó el cerebro en soluciones de sacarosa de la siguiente manera: por 24 horas en una solución crioprotectora al 10 % de sacarosa (Winkler) disuelta en tampón fosfato salino ya descrito (PBS); después el cerebro se traspasó a una solución de sacarosa al 30% por 48 horas a 4 °C. Una vez terminada la deshidratación se realizaron cortes coronales del cerebro de 30 micrómetros (μm) de espesor con un crióstato (Leica, modelo CM 1510) a una temperatura de -20 °C. Se utilizó el atlas de Paxinos y Watson (1986) para clasificar

los cortes a utilizar en esta memoria. Los cortes obtenidos se mantuvieron en PBS 1X más 0,02% de azida a 4°C hasta un máximo de dos semanas para su utilización. Para almacenar cortes coronales de tejido cerebral por un mayor tiempo, se utilizó una solución anticongelante preparada con 80 ml de agua destilada, más 60 ml de glicerol (Merck), más 60 ml de etilenglicol (Merck), más 0,278 grs. de NaH_2PO_4 (Winkler), más 1,09 grs. de Na_2HPO_4 (Winkler), a -20 °C. Para utilizar posteriormente estos cortes, estos debieron ser lavados 6 veces por 10 min cada vez en una solución de PBS 1X.

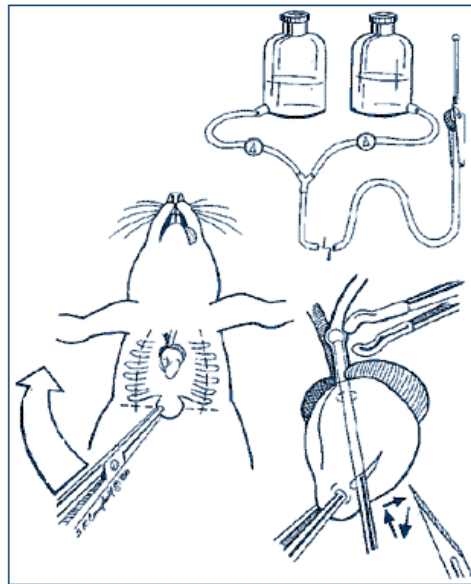


Figura N° 7. Esquema Demostrativo de Perfusión

La figura muestra la posición de la rata, el abordaje al corazón y el sitio hasta donde se introduce la cánula de perfusión en él. (Neuroscience Associates, 2005).

V.2.6.2. Inmunohistoquímica contra TrkB

La localización y expresión de TrkB en hipocampo se realizó mediante inmunohistoquímica. Esta metodología se basó en el procedimiento modificado de Campusano y cols. (2002). Brevemente, una vez obtenidos los cortes, se depositaron en placas de 24 pocillos (Falcon) y se lavaron 2 veces por 15 min cada vez, con agua oxigenada (Fasa) al 0,5% preparada en PBS 1X. Luego de ello se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno, en PBS 1X. Los cortes se

incubaron en solución de bloqueo que consistió para cada ml de PBS 1X pH 7,4, en suero normal de cabra (NGS, Sigma) 3% y azida de sodio 0,02% y se mantuvieron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego fueron traspasados a pocillos que contienen la misma solución de bloqueo, a la que se le agrega el primer anticuerpo (policlonal, TrkB (794): SC-12, generado en conejo, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) a diluciones de 1/8000 y 1/4000, donde se mantuvieron por 30-40 horas en agitación orbital a 4 °C. Como control para comprobar la especificidad del anticuerpo, en paralelo se realizó la omisión del primer anticuerpo en la incubación por 30-40 horas, utilizándose solamente solución de bloqueo. Pasado ese tiempo, los cortes se lavaron 3 veces por 15 min cada vez, con PBS 1X para luego ser incubados por 2 horas con el segundo anticuerpo (policlonal, anti conejo, obtenido en cabra, Laboratorios Vector) a una dilución 1/1000, en una solución que contenía albúmina sérica bovina (BSA, Rockland), 0,4% tritón X-100 (Sigma-Aldrich) y PBS 1X. A continuación, se lavaron 3 veces por 15 min con PBS 1X y se incubaron por 90 min con el complejo avidina-biotina conjugada a la enzima peroxidasa (Kit ABC, elaborado por Laboratorios Vector) a una dilución 1/250. Posteriormente, se lavaron los cortes 2 veces por 15 min con PBS 1X y una vez por 15 min con tampón Tris (TRIS-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6). La marca se reveló con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Sigma, N° catálogo D4168) 0,05% (p/v) en agua oxigenada 0,01% (p/v), cloruro de níquel 0,25% (p/v) y PBS 1X durante 5-10 min en oscuridad. Los cortes se lavaron nuevamente dos veces por 15 min con tampón Tris y una vez, por el mismo tiempo, en PBS 1X. Luego los cortes se montaron en portaobjetos xilinizados especiales para la adherencia de tejidos (Sigma-Aldrich) y se cubrieron con medio de montaje resinoso para microscopía (Entellan, Merck). Los cortes montados se dejaron secar por aproximadamente 24 horas para su análisis por microscopía óptica (figura 8).

La cámara digital que se utilizó en la obtención de imágenes fotográficas desde el microscopio (marca Olympus BX41) de los cortes cerebrales correspondientes a la IHQ contra TrkB es marca Olympus, modelo Camedia C-3030, de 3,3 megapíxeles, con un adaptador especial para dicho microscopio.



Figura N° 8. Fotografía de cortes Coronales de Cerebro Analizados por IHQ contra TrkB

Fotografía de un portaobjeto que contiene cortes coronales procesados por IHQ para detección de TrkB.

V.2.6.3. Detección de NeuN por inmunohistoquímica

Cortes de cerebro de 30 μm de grosor fueron utilizados para la detección de NeuN por inmunohistoquímica (Online information center of Immunohistochemistry, 2006). Estos cortes fueron depositados en placas especializadas de 24 pocillos y se lavaron 2 veces, por 15 min cada vez, con agua oxigenada al 0,5% en PBS 1X. Luego de ello se realizaron 3 lavados de 15 min cada uno, en PBS 1X a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron en agitación durante 1 hora en solución de bloqueo a temperatura ambiente (para cada ml de PBS 1X 0,01 M pH 7,2 se utiliza NGS 3%, azida de sodio 0,05%, BSA 1%, Tween 0,05%, Tritón 0,1%). Luego fueron traspasados a pocillos que contenían la misma solución de bloqueo a la que se le agrega el primer anticuerpo Anti-NeuN (Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody), a una dilución 1/1000, por 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, los cortes fueron lavados 3 veces por 15 min cada vez, con PBS 1X e incubados por 1 hora con el segundo anticuerpo (Goat Anti Mouse IgG, Biotin Conjugated Affinity Purified Antibody, Laboratorios Vector), a una dilución 1/1000, en una solución que contenía BSA 0,4%, 0,1% tritón X-100 y PBS 1X, a temperatura ambiente. A continuación, los cortes se lavaron 3 veces por 15 min con PBS 1X y se incubaron por 90 min con el complejo avidina-biotina conjugada a la enzima peroxidasa (Kit ABC), a una dilución 1/250. Posteriormente, los cortes se lavaron 2 veces por 15 min con PBS 1X y una vez por 15 min con tampón Tris (TRIS-HCL 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6) a temperatura ambiente. La marca se reveló con DAB 0,05% (p/v) en agua oxigenada 0,01% (p/v), cloruro de níquel 0,25% (p/v) y PBS 1X durante 2-8 min en oscuridad, tras lo cual se lavaron nuevamente dos veces por 15 min con tampón Tris y una

vez, por el mismo tiempo, en PBS 1X. Los cortes se montaron en portaobjetos xilanizados de la misma manera en como se procedió con los cortes para TrkB, para ser luego analizados por microscopía óptica.

V.2.7. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó utilizando el Test de t de Student no pareado de dos colas. Se consideró que los resultados independientes son significativamente diferentes cuando $p < 0.05$. Para ello se comparó los resultados de ratas MMI con los de las ratas control. Por otro lado, se comparó los resultados de MMI+T4 con los de las ratas control.

VI. RESULTADOS

VI.1. Evaluación del modelo de hipotiroxinemia materna

En el primer modelo experimental de hipotiroxinemia materna que se planteó originalmente, correspondiente a una dieta baja en yodo, los animales presentaron un alto grado de estrés debido a las inyecciones diarias de hormonas; excesiva manipulación de hembras gestantes;

“pellets” húmedos que provocó diarrea en las madres y en algunas de las crías obtenidas; el bajo porcentaje de cruza y gestaciones efectivas obtenidas; además del alto costo que significó el manejo dietario, el tiempo necesario para lograr el fenotipo experimental y su poca eficiencia, ya que luego de la detección del estro, un 25% de las hembras fueron preñadas y de éstas, solamente un 16,6% parió y un 8,3% conservó la camada, sin alimentarse de ella.

El modelo experimental que se utilizó en la presente memoria para desarrollar hipotiroxinemia transiente a ratas preñadas, fue descrito por Eva Ausó *et al*, en el año 2004 (correspondiente al modelo 2). La hipotiroxinemia suave fue producida durante los días E12 y E15 de preñez, mediante la administración de MMI al 0,02% en el agua de beber (ver materiales y métodos). Con el objetivo de evaluar que efectivamente la ejecución de este modelo experimental generó ratas hipotiroxinémicas se midieron las concentraciones plasmáticas de T_3T , T_4L y TSH en el plasma aislado de cada rata preñada al final del tratamiento (día E15). En las figuras 9, 10 y 11 se graficaron los promedios y su desviación estándar de las concentraciones plasmáticas expresadas en ng/ml, de T_3T , T_4L y TSH, respectivamente. El análisis de estos datos mostró que la administración de MMI por cuatro días genera una significativa reducción, específicamente en las concentraciones de T_4L , manteniéndose las concentraciones plasmáticas normales de T_3T y TSH. Estos resultados indicaron que el tratamiento con MMI fue efectivo en generar una hipotiroxinemia leve. Por otro lado, la administración de T_4 durante el tratamiento con MMI no mostró diferencias significativas con el control en las concentraciones de T_3T , T_4L y TSH, indicando que la T_4 que fue administrada en forma subcutánea recuperó las concentraciones normales plasmáticas de estas hormonas en el plasma de las ratas que fueron tratadas con MMI.

Los datos con los cuales se graficaron las figuras de los resultados, se muestran en la Tabla N° 1 A y B. Se realizaron tres repeticiones del modelo, los datos mostrados corresponden al promedio de los experimentos 1, 2 y 3.

Tabla N° 1.A. Determinación de las concentraciones plasmáticas de T_3T y T_4L .

En la siguiente tabla se muestran los valores promedio y desviación estándar, obtenidos en las muestras plasmáticas de los animales en estudio, los cuales fueron graficados en las figuras 9 y 10. Se midió la concentración de hormonas en ng/ml.

Grupo	T4L ng/ml		T3T ng/ml	
	Promedio	Desviación Estandar	Promedio	Desviación Estandar
Control	3,106	1,415	41,05	1,417
MMI	0,788	0,491	70,3	21,253
MMI+T4	4,45	1,017	40	0

Tabla N° 1.B. Determinación de las concentraciones plasmáticas de TSH.

Se muestran los valores promedio obtenidos y su desviación estándar. Estos valores fueron graficados en la figura 11. Se midió la concentración de hormona en ng/ml.

Grupo Experimental	TSH ng/ml	
	Promedio	Desviación Estandar
Control	2,54	1,27
MMI	2,48	0,98
T ₄	2,073	0,80

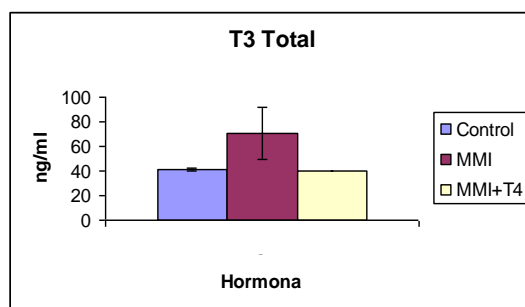


Figura N° 9. Concentraciones plasmáticas de T₃ Total

Se grafican las concentraciones plasmáticas de los tres distintos grupos correspondientes al segundo modelo experimental de hipotiroxinemia. La barra azul corresponde a los animales control; la barra morada corresponde a los animales que recibieron MMI durante los días E12-E15; y la barra amarilla corresponde a los animales tratados con MMI+T₄. Los valores hormonales son expresados en ng/ml y se encuentran en la tabla **1A**.

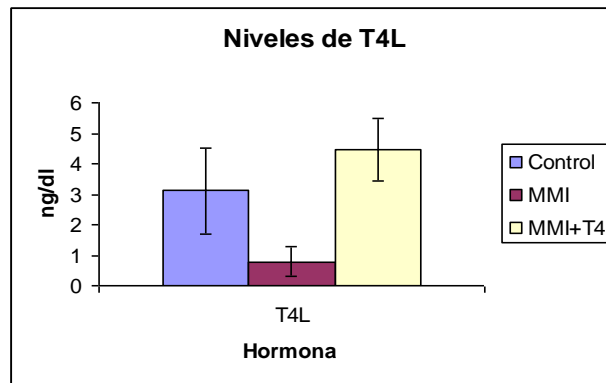


Figura N° 10. Concentraciones plasmáticas de T4 Libre

Se grafican las concentraciones plasmáticas de los tres distintos grupos correspondientes al segundo modelo experimental de hipotiroxinemia. La administración de T₄ durante el tratamiento con MMI, recupera los niveles de T₄L. Las ratas tratadas con MMI tienen una disminución significativa de T₄, que se recupera en las ratas inyectadas con T₄.

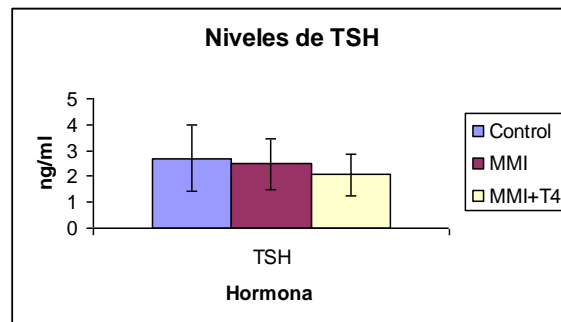


Figura N° 11. Concentraciones plasmáticas de TSH

Se grafican las concentraciones plasmáticas de TSH de los tres distintos grupos correspondientes al segundo modelo experimental de hipotiroxinemia que se obtuvieron mediante RIA. Los valores hormonales son expresados en ng/ml y se encuentran en la tabla **1B**. Se puede apreciar que las concentraciones en los distintos fenotipos experimentales son similares al control.

VI.2. Efecto la hipotiroxinemia materna sobre la composición proteica de los homogenizados y las DPSs del telencéfalo de su progenie

La DPS es un organelo postsináptico altamente plástico que responde a las demandas de la actividad de esa sinapsis. Entre los mecanismos moleculares de plasticidad que se observan en las DPSs se encuentran cambios en el contenido de las proteínas que la componen. Por lo tanto, nuestro segundo objetivo fue analizar la composición de las DPSs de ratas adultas que durante su gestación padecieron de hipotiroxinemia leve durante los días E12-E15. En la presente memoria nos concentramos en analizar la expresión de las subunidades de los receptores glutamatérgicos como NMDA y Kainato; la de los receptores de NT como TrkA, TrkB y P-75; y la de la proteína de anclaje PSD95. El contenido de estas proteínas se analizó tanto en las DPSs como en el homogenizado total (H1) de telencéfalo. El objetivo del análisis del H1 fue para determinar si los cambios en el contenido en la DPS se debieron a cambios en la expresión y/o localización de las proteínas en estudio. Una vez que las ratas hijas del modelo experimental utilizado alcanzaron los 60 días de edad se procedió con la metodología de preparación de las DPSs, tal como se indicó en materiales y métodos, para aislar el telencéfalo, que corresponde al cerebro anterior, y que comprende principalmente a la corteza cerebral e hipocampo.

Se realizaron tres experimentos independientes (n=3). Las muestras de cada experimento (de cada n) correspondían a 6 cerebros de ratas. El análisis densitométrico utilizado y que se describe a continuación para todas las subunidades analizadas, expresa el porcentaje de cambio con respecto al control (promedio más la desviación estándar) y, entre paréntesis se indicó a

“n” como el número de experimentos independientes y p, su significancia, las siglas n.s., indican que el resultado no fue significativo.

Lo ocurrido con el contenido y expresión de las distintas unidades analizadas en esta memoria, y a manera de resumen, se pueden apreciar en las figuras **18** y **19**, en las cuales se graficó los cambios ocurridos en los inmunoblots de los animales MMI y MMI+T₄, con respecto al control.

VI.2.1 Determinación del contenido y expresión de TrkB en el telencéfalo

Con el objetivo de determinar el nivel de expresión de la proteína TrkB en el H1 y en las DPS del telencéfalo, se analizaron estas muestras mediante inmunoblots. En la figura **12** se muestra dos fotografías representativas de inmunoblots dirigidos a detectar la expresión de TrkB en el H1 y en la DPS de ratas adultas provenientes del segundo modelo experimental de hipotiroxinemia, respectivamente. El anticuerpo contra TrkB reconoce específicamente dos polipéptidos. Un polipéptido corresponde a la banda de 145 KDa (peso molecular). Este polipéptido es la forma completa de TrkB. El segundo polipéptido se observa como una banda de 95 KDa que corresponde a la forma truncada de TrkB. Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de la forma completa de TrkB se realizó un análisis densitométrico de la banda de 145 kDa. No se analizó la forma truncada de TrkB debido a que aún no está claro el rol fisiológico de esta molécula.

TrkB en la DPS mostró un aumento significativo de un $10 \pm 1,73\%$ ($p < 0,01$, $n=3$) en comparación al control. El análisis densitométrico de TrkB en el homogenizado mostró un aumento de un $15 \pm 5,29\%$ ($p < 0,05$, $n=3$) con respecto al control. La adición de T₄ al tratamiento con MMI durante la gestación revirtió la expresión de TrkB a valores basales acercándola al valor control. En la DPS hay una disminución de un $6 \pm 30\%$ (n.s., $n=3$) con respecto al control y en el homogenizado también disminuyó en un $7 \pm 2\%$ (n.s., $n=3$), lo que puede observarse en las figuras **12 A** y **B** y un resumen de lo ocurrido en el gráfico de la figura **18**. Estas disminuciones no fueron significativamente diferentes con respecto al control.

Estos resultados indican que el aumento de TrkB observado en las DPSs de las ratas MMI no correspondería a un aumento solo de la localización de TrkB en la DPS, sino también a un aumento en la expresión de TrkB y por ende, un aumento en la cantidad total de TrkB en el telencéfalo. Nuestros resultados también muestran que el aumento en la expresión de TrkB en

el telencéfalo de ratas MMI es revertido por T₄, indicando que el aumento de TrkB se debe a la disminución de T₄ que ocurrió durante la gestación (ver gráfico en la figura 19).

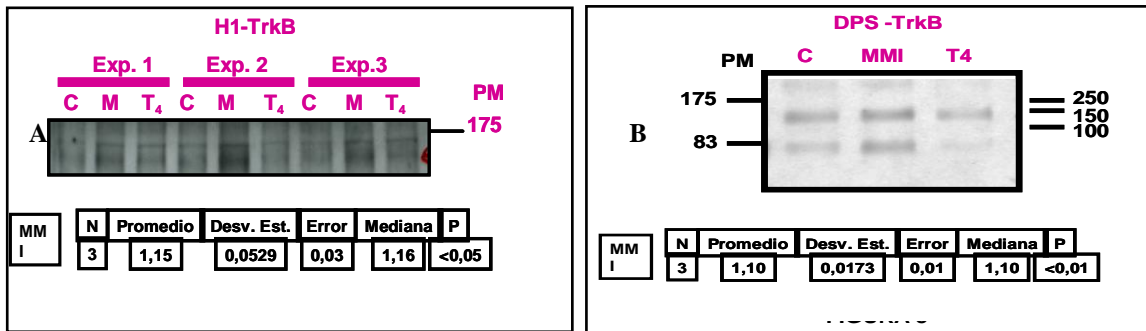


Figura N° 12. Efecto de la hipotiroidemia sobre la expresión de TrkB en homogenizados y DPSs del telencéfalo de ratas.

Se analizó el nivel de expresión de TrkB en el homogenizado total (H1) del cerebro (A) y en las DPSs (B). La membrana fue analizada por western blot con el anticuerpo contra TrkB a una dilución de 1/4000. C, corresponde a control; MMI, corresponde a ratas que provienen de madres hipotiroidémicas; T₄, corresponde a los animales hijos de madres tratadas con Metimazol y T₄ subcutánea durante la gestación; Exp 1, corresponde al experimento número uno realizado, lo mismo para Exp 2 y 3; PM, corresponde al peso molecular. En el recuadro se muestra el análisis estadístico de MMI con respecto al control, en donde N es la cantidad de experimentos realizados, Desv.Est. es la desviación estándar y P representa el grado de significancia. Se grafica lo mismo para todas las figuras del presente trabajo.

VI.2.2. Determinación del contenido y expresión de las subunidades NR1 y NR2 A/B del receptor de NMDA en el telencéfalo

El contenido y expresión de NR1 y NR2 A/B fue analizado tanto en el H1 y en las DPSs del telencéfalo de las ratas hijas del segundo modelo experimental mediante western blot. La figura 13 muestra una fotografía representativa de los western blots dirigidos a analizar la subunidad NR1 del receptor de NMDA. El anticuerpo contra NR1 reconoce un polipéptido de aproximadamente 120 kDa. Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de NR1 en la DPS y en el homogenizado total, la banda correspondiente al polipéptido de 120 kDa fue analizada por densitometría óptica (ver materiales y métodos). Se observó un aumento en un

35 ± 10% (p<0,05, n=3) de la expresión de NR1 en el H1 del telencéfalo de ratas MMI en comparación con el control. No se observaron cambios significativos en la expresión de la subunidad NR1 en las DPSs (1 ± 4,62%, n.s., n=3), esto se puede apreciar en las figuras **13 A** y **B** y en el gráfico de la figura **18**. Estos resultados indicaron que hay un aumento en la expresión de NR1 total en el telencéfalo, sin embargo no existieron cambios significativos a nivel del contenido de NR1 en la DPSs. La expresión de NR1 en el H1 de ratas MMI+T₄ mostró una disminución de un 7 ± 21% (n.s., n=3) con respecto al control. Estos resultados no fueron significativamente distintos al control. En la DPS de animales MMI+T₄ se observó una disminución de un 13 ± 14% (n.s., n=3) el cual tampoco fue significativamente distinto con respecto al control. La figura **14** muestra dos fotografías representativas de inmunoblots contra la subunidad NR2A/B del receptor de NMDA. El anticuerpo contra NR2A/B reconoce un polipéptido de aproximadamente 180 kDa, peso molecular descrito para NR2A/B. El contenido de NR2A/B en el homogenizado total de ratas MMI experimentó un aumento de un 12 ± 14,7% (p n.s, n=3) el cual no fue significativamente distinto del control. En la DPS de animales MMI se observó un aumento de un 5 ± 23,9% (n.s, n=3). Este aumento tampoco fue significativo.

En el H1 de ratas MMI+T₄ presenta un aumento de un 5 ± 12% (n.s, n=3) con respecto al control. Por otro lado, NR2A/B en la DPS de ratas MMI+T₄ disminuyó en un 11 ± 5% (n.s, n=3) (ver gráfico en la figura **19**), lo cual tampoco fue significativamente diferente.

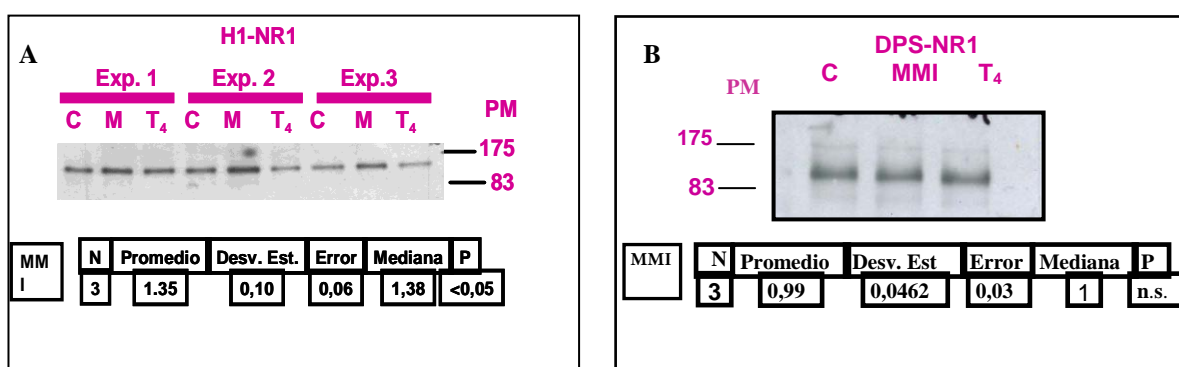


Figura N° 13. Expresión de NR1 en homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.

Se analizó el nivel de expresión de NR1 en el H1 de cerebro (**A**) y en las DPSs (**B**). La membrana fue analizada por western blot con el anticuerpo contra NR1 a una dilución de 1/1000. **C**, corresponde a control; **MMI**, corresponde a ratas que provienen de madres hipotiroxinémicas; **T₄**, corresponde a los animales hijos de madres

tratadas con Metimazol y T₄ subcutánea durante la gestación; **Exp 1**, corresponde al experimento número uno realizado, lo mismo para **Exp 2** y **3**; **PM**, corresponde al peso molecular. **N** es la cantidad de experimentos realizados; **Desv.Est.** es la desviación estándar; **P** representa el grado de significancia.

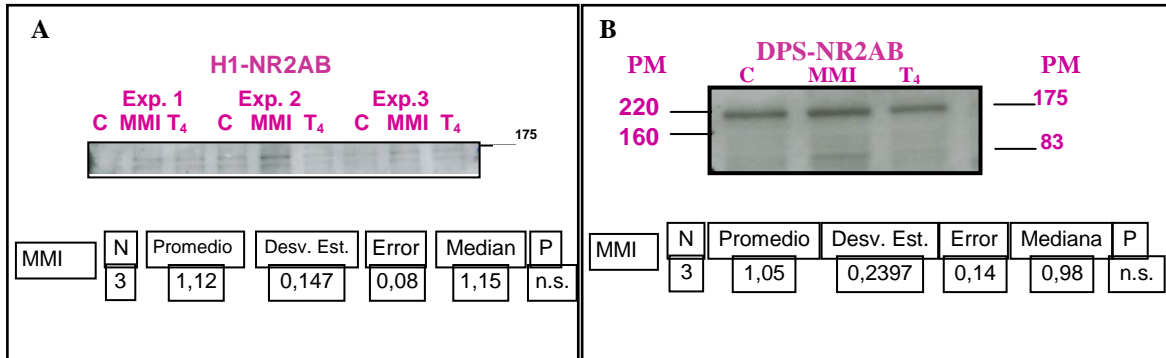


Figura N° 14. Expresión de NR2 A/B en homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.

Se analizó el nivel de expresión de NR2 A/B en el H1 de cerebro (A) y en las DPSs (B). La membrana fue analizada por western blot con el anticuerpo contra NR2 A/B a una dilución de 1/2000. **C**, corresponde a control; **MMI**, corresponde a ratas que provienen de madres hipotiroxinémicas; **T₄**, corresponde a los animales hijos de madres tratadas con Metimazol y T₄ subcutánea durante la gestación; **Exp 1**, corresponde al experimento número uno realizado, lo mismo para **Exp 2** y **3**; **PM**, corresponde al peso molecular. **N** es la cantidad de experimentos realizados; **Desv.Est.** es la desviación estándar; **P** representa el grado de significancia.

VI.2.3. Determinación del contenido y expresión de PSD95 en el telencéfalo

PSD95 es considerado un marcador de la DPS. Su función fisiológica está asociada a la regulación y agregación de receptores a la DPS, estabilización estructural de las uniones sinápticas y la transducción de señales de los receptores de membrana (Lavado-Autric *et al.*, 2003). La expresión de PSD95 fue analizada por inmunoblot en el H1 del telencéfalo de los animales en experimentación. La figura 15 muestra una fotografía representativa de un inmunoblot contra PSD95. El anticuerpo contra PSD95 reconoce un polipéptido de aproximadamente 95 kDa, el cual corresponde a PSD95. Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de PSD95 en el homogenizado total, la banda correspondiente al polipéptido de 95 kDa fue analizada por densitometría óptica. Se observó un aumento en un

41 ± 7% (p<0,01, n=3) en el H1 de ratas MMI en comparación al control. Estos resultados indicaron que hubo un aumento en la expresión de PSD95 en el telencéfalo (ver gráfico de la figura 18). El H1 de ratas MMI+T₄ también presentó un aumento de un 16 ± 5% (p< 0,05, n=3) con respecto al control (ver gráfico de la figura 19), ya que por el hecho de ser una proteína estructural, se encuentra aumentada, pero no en los mismos niveles que con MMI.

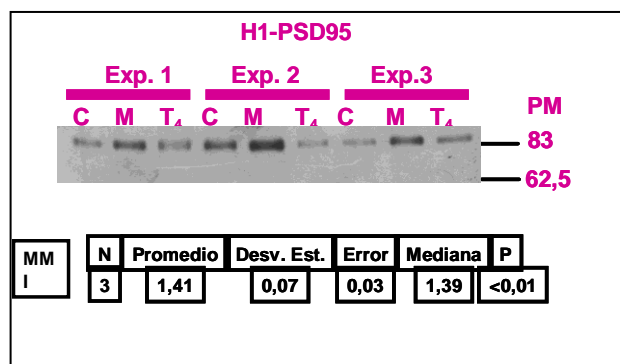


Figura N° 15. Expresión de PSD95 en homogenizado (H1) del telencéfalo de ratas.

Se analizó el nivel de expresión de PSD95 en el H1 de cerebro. La membrana fue analizada por western blot con el anticuerpo contra PSD95 a una dilución de 1/250. **C**, corresponde a control; **MMI**, corresponde a ratas que provienen de madres hipotiroxinémicas; **T₄**, corresponde a los animales hijos de madres tratadas con Metimazol y T₄ subcutánea durante la gestación; **Exp 1**, corresponde al experimento número uno realizado, lo mismo para **Exp 2 y 3**; **PM**, corresponde al peso molecular. **N** es la cantidad de experimentos realizados; **Desv.Est.** es la desviación estándar; **P** representa el grado de significancia.

VI.2.4. Determinación del contenido y expresión de P75 en el telencéfalo

El contenido y expresión de P75 fue analizado por inmunoblot tanto en el H1 como en las DPSs del telencéfalo de ratas pertenecientes al segundo modelo experimental. La figura 16 muestra dos fotografías representativas de inmunoblots contra P75. El anticuerpo contra P75 reconoció un polipéptido de aproximadamente 75 kDa, el cual corresponde a P75. Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de NR1 en la DPS y en el H1, la banda correspondiente al polipéptido de 75 kDa fue analizada por densitometría óptica. Se observó un aumento en un 10 ± 29,9% (n.s, n=3) en el H1 del telencéfalo de ratas MMI en comparación al control. Se observó un aumento de un 10 ± 61,5% (n.s, n=3) en las DPSs de

ratas MMI en comparación a los animales control. El análisis estadístico de estos resultados mostró que las diferencias encontradas tanto en el H1 como en las DPS no fueron significativamente diferentes respecto al control (figuras **16 A y B** y gráfico en la figura **18**).

El análisis del H1 de las ratas MMI+T₄ mostró una disminución de un 9 ± 39% (n.s., n=3) con respecto al control. En la DPS de animales MMI+T₄ también hay una disminución en un 16 ± 44% (n.s., n=3) con respecto al control (figura **19**). En ambos casos, esta disminución no fue significativamente distinta a los animales control.

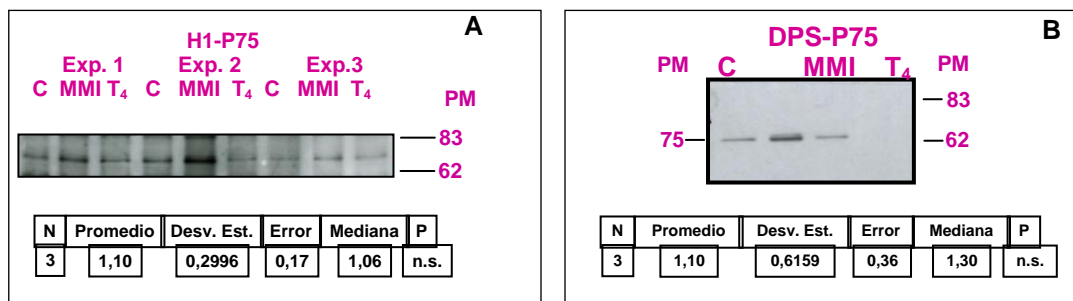


Figura N° 16. Expresión de P75 en homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.

Se analizó el nivel de expresión de PSD95 en el homogenizado total del cerebro (**A**) y en las DPSs (**B**). La membrana fue analizada por western blot con el anticuerpo contra P75 a una dilución de 1/1000. **C**, corresponde a control; **MMI**, corresponde a ratas que provienen de madres hipotiroxinémicas; **T₄**, corresponde a los animales hijos de madres tratadas con Metimazol y T₄ subcutánea durante la gestación; **Exp 1**, corresponde al experimento número uno realizado, lo mismo para **Exp 2 y 3**; **PM**, corresponde al peso molecular. **N** es la cantidad de experimentos realizados; **Desv.Est.** es la desviación estándar; **P** representa el grado de significancia.

VI.2.5. Determinación del contenido y expresión de Trk A en el telencéfalo

El contenido y expresión de TrkA es analizado por inmunoblot tanto en el H1 y DPS del telencéfalo de ratas hijas del segundo modelo experimental. La figura **17** muestra dos fotografías representativas de inmunoblots contra TrkA. El anticuerpo contra TrkA reconoce un polipéptido de aproximadamente 140 kDa, el cual corresponde a TrkA. Con la finalidad de determinar el nivel de expresión de TrkA en el H1 y en la DPS, la banda correspondiente al polipéptido de 140 kDa fue analizada por densitometría óptica. En el H1 de los animales MMI se observó un aumento de un 12 ± 7.5% (n.s., n=3) en comparación a los animales control. Se

observó una disminución específica en la DPS de un $6 \pm 4,9\%$ (n.s., n=3). El análisis estadístico de estos resultados mostró que estas diferencias no eran significativamente diferentes al control (figuras 17 A y B y gráfico en la figura 18). Los resultados de los animales MMI+T₄, muestran en el H1 una disminución de un $3 \pm 5\%$ (n.s., n=3) y en la DPS una disminución de un $4 \pm 3\%$ (n.s., n=3), lo cual se pudo apreciar en el gráfico de la figura 19. Estas diferencias tampoco fueron significativas con respecto al control.

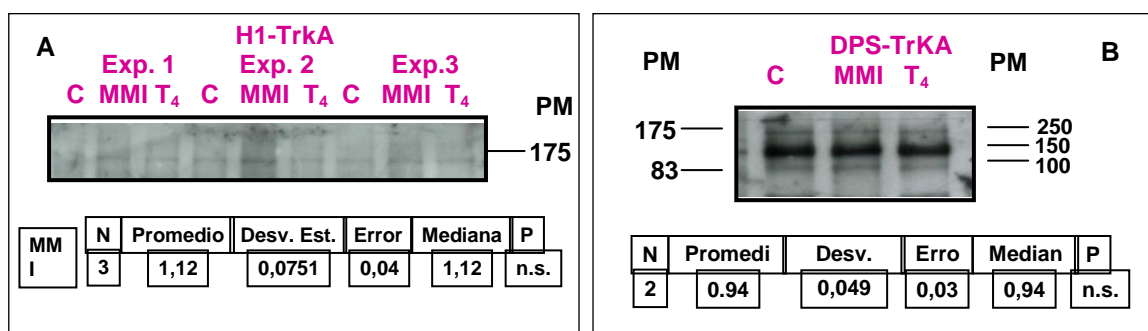


Figura N° 17. Expresión de TrkA en Homogenizado (H1) y DPS del telencéfalo de ratas.

Se analizó el nivel de expresión de TrkA en el H1 de cerebro. La membrana fue analizada por western blot con el anticuerpo contra TrkA a una dilución de 1/200. **C**, corresponde a control; **MMI**, corresponde a ratas que provienen de madres hipotiroxinémicas; **T₄**, corresponde a los animales hijos de madres tratadas con Metimazol y T₄ subcutánea durante la gestación; **Exp 1**, corresponde al experimento número uno realizado, lo mismo para **Exp 2** y **3**; **PM**, corresponde al peso molecular. En el recuadro se muestra el análisis estadístico de MMI con respecto al control, en donde **N** es la cantidad de experimentos realizados, **Desv.Est.** es la desviación estándar y **P** representa el grado de significancia.

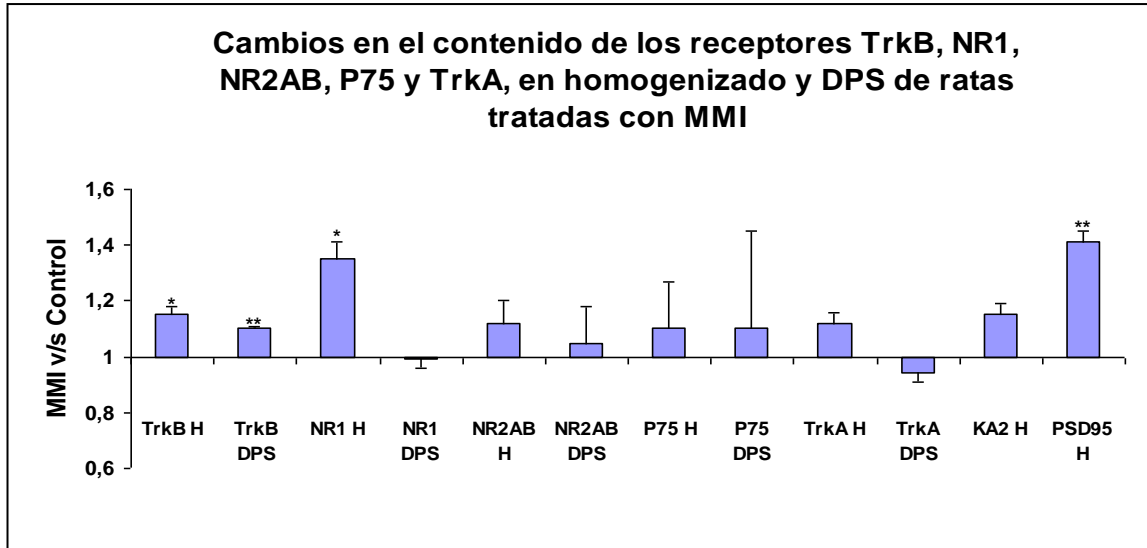


Figura N° 18. Comparación de los niveles de expresión y contenido de las distintas proteínas en el homogenizado y DPS de ratas MMI.

Con el objetivo de evaluar la expresión de diversas proteínas que se encuentran en el telencéfalo y que componen la DPS se realizó un análisis densitométrico de las bandas obtenidas en los inmunoblots respectivos. Los valores obtenidos de tres experimentos distintos son promediados y sometidos a un análisis estadístico. Los promedios de cada muestra se graficaron en barras y fueron expresados como la razón entre la densitometría obtenida para los animales MMI y los controles. La desviación estándar se muestra como barras T. La primera barra corresponde al H1 y la segunda barra a las DPSs. Los resultados obtenidos en las subunidades GluR1, mGluR1 y α KA2 se analizaron, sin embargo no se muestran como parte fundamental en esta memoria, ya que no fueron relevantes. Sin embargo, en este gráfico se muestra a modo de ejemplo, lo sucedido con α KA2, que también experimentó un aumento, pero no significativo.

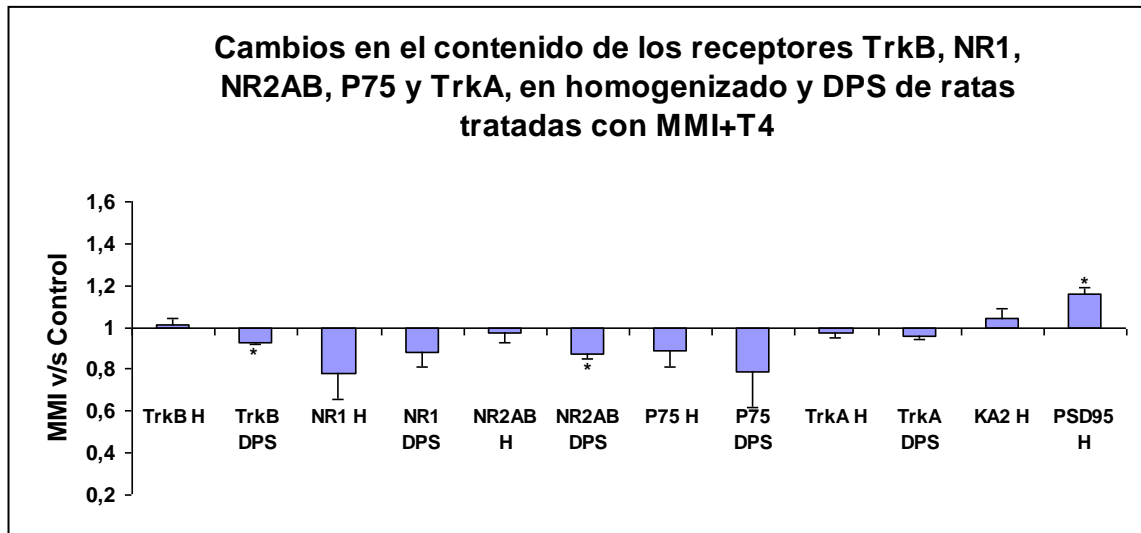


Figura N° 19. Comparación de los niveles de expresión y contenido de las distintas proteínas en el homogenizado y DPS de ratas MMI+T₄.

La adición de T₄ al tratamiento con MMI durante la gestación revirtió la expresión de TrkB a valores basales acercándola al valor control (figuras 12, 13 y 18). Esto indicó que el aumento de TrkB observado en los homogenizados y DPSs del telencéfalo de las ratas que padecieron de hipotiroxinemia durante su gestación es producto de una disminución específica de la T₄. En general, lo que ocurre con todos los receptores es una disminución en los contenidos de ellos, tanto en el H1, como en las DPSs, revirtiéndose lo observado con el tratamiento con MMI, excepto lo sucedido con PSD95, que por el hecho de ser una proteína estructural, se encontró aumentada, pero no en los mismos niveles que con MMI. El gráfico se construyó comparando a los animales MMI+T₄ con los animales control. La desviación estándar se muestra como barras T. La primera barra corresponde al H1 y la segunda barra a las DPSs. Se muestra, además, lo sucedido con α KA2, que experimentó un pequeño aumento, pero no significativo.

VI.3. Determinación del contenido de BDNF

Durante el desarrollo de la presente memoria, con la colaboración de la Dra. Claudia Riedel, de la Universidad Nacional Andrés Bello, se realizó la determinación del contenido de BDNF en los telencéfalos de las ratas en experimentación (ver metodología en anexos).

Debido a que uno de los cambios más significativos que se observó en los animales MMI fue un aumento en el contenido de TrkB, se procedió a analizar que sucedía con el contenido de su ligando BDNF en el telencéfalo. Para ello se analizó el contenido de BDNF a partir del H1 de telencéfalo extraído durante el proceso de fraccionamiento celular (ver materiales y métodos). Con el objetivo de liberar y solubilizar el BDNF del H1, éste fue sonificado y tratado con detergentes. Este método posee las ventajas de ser más sensible, reproducible y cuantificable que la determinación de BDNF por inmunoblot. En la figura 20 se muestran los valores promedios correspondientes al contenido de BDNF obtenido por el método de ELISA para las distintas muestras, los resultados obtenidos se expresaron como promedio más desviación estándar. Para el telencéfalo de ratas MMI se obtuvo 108 ± 72 pg de BDNF /mg de proteína; para el de ratas control se obtuvo un promedio de 47 ± 15 pg de BDNF /mg de proteína y para los animales MMI+T₄ se obtuvo 80 ± 49 pg de BDNF /mg de proteína. El análisis estadístico de estos resultados indicó que no hay diferencia significativa en la concentración de BDNF en las distintas muestras. Por lo tanto, estos resultados indican que globalmente la hipotiroxinemia inducida durante la gestación no produjo alteraciones en el contenido de BDNF.

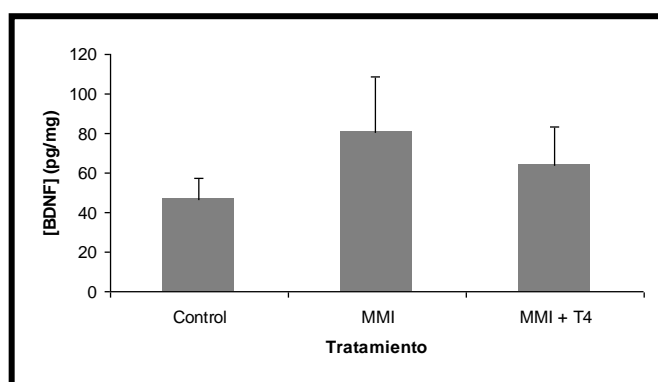


Figura N° 20. Contenido de BDNF en el telencéfalo de ratas experimentales

El contenido de BDNF fue determinado a partir de los homogenizados de los telencéfalos de los distintos grupos experimentales mediante el método de ELISA. Los valores son expresados en pg de BDNF/mg de proteína. La desviación estándar se muestra como barras T.

VI.4. Distribución de TrkB en el hipocampo de ratas MMI

Los resultados obtenidos por inmunoblots mostraron un 15% de aumento significativo de TrkB en el H1 y un 10% de aumento significativo de TrkB en las DPSs del telencéfalo de ratas MMI con respecto al control. Debido a que los datos de los inmunoblots no permiten identificar en qué parte del telencéfalo ocurrió el aumento de TrkB, se procedió a localizar TrkB por inmunohistoquímica en cortes coronales de los cerebros de los distintos grupos experimentales en estudio. En la figura 22 se observan tres fotografías correspondientes animales Control, MMI y MMI+T₄, respectivamente. Una vez revelados los cortes, el marcaje fue analizado por microscopía de luz, con un aumento de 10 X, utilizando el microscopio Olympus BX41.

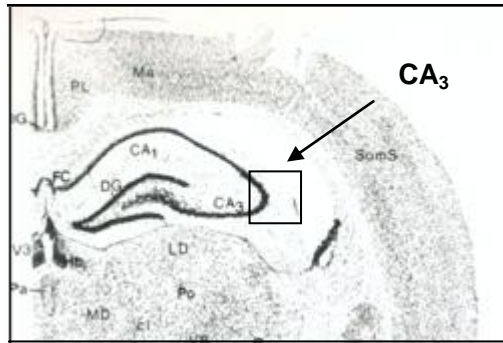


Figura N° 21. Localización del CA3 del Hipocampo y área de análisis.

Fotografía de un corte coronal del hemisferio izquierdo del cerebro de rata, obtenido del atlas de Paxinos y Watson, 1986. Con una flecha se indica un recuadro, de 250 μm cuadrados, que representa el área de conteo de la zona CA3.

Análisis de la inmunohistoquímica mostró intensa marcación para TrkB en las neuronas musgosas y piramidales que conforman las zonas CA3, CA1 y giro dentado de los animales experimentales tanto controles, como los tratados con MMI y con MMI+T₄ (figura 22).

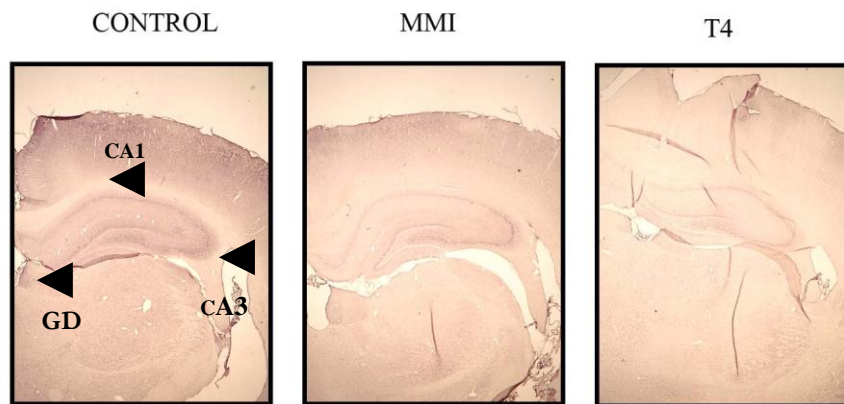


Figura N° 22. Inmunohistoquímica de TrkB

Fotografía representativa de la inmunohistoquímica contra TrkB, realizada en cortes coronales de cerebro de 30 μm de grosor. La inmunohistoquímica de TrkB se describe en la sección de materiales y métodos. La marcación de TrkB fue analizada por microscopía de luz utilizando el microscopio Olympus BX41. Se utilizó un aumento de 10X. Las flechas indican zona CA1, CA3 y Giro Dentado (GD).

Se detectó marca específica para TrkB en el *stratum oriens*, zona externa del CA3 en el hipocampo de animales Control, MMI y MMI+T₄. Se procedió a analizar cuantitativamente esta marcación en cortes coronales correspondientes al plato 19 del atlas de Paxinos y Watson (ver anexos). Se cuantificó la zona del *stratum oriens* delimitado en la figura 21. En la figura 23 se grafica el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. En el grupo control se observó un 33 ± 18 células marcadas; en los animales MMI de 94 ± 36 ; y en los MMI+T₄ un 14 ± 8 . El análisis cuantitativo mostró que los animales MMI tienen 94% más de marcación positiva para TrkB que los animales control. Por otro lado, los animales MMI+T₄ no presentan diferencia significativa con los animales control. Estos resultados sugieren que la adición de T₄ a las ratas MMI logró revertir el fenotipo inducido por MMI.

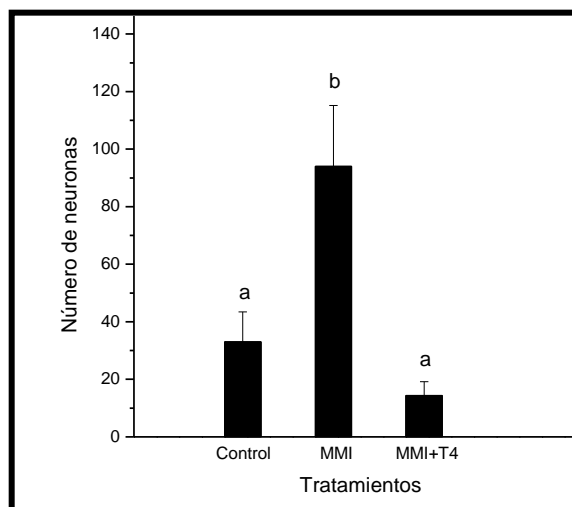


Figura N°23. Cuantificación de la marcación para TrkB en el *Stratum oriens*

Se procedió a contar las marcas correspondientes a la detección de TrkB. Para ello se tomaron cortes de cerebro del nivel 19 (atlas de Paxinos y Watson) y las marcas de TrkB fueron visualizadas por microscopia de luz con un aumento de 10 X.

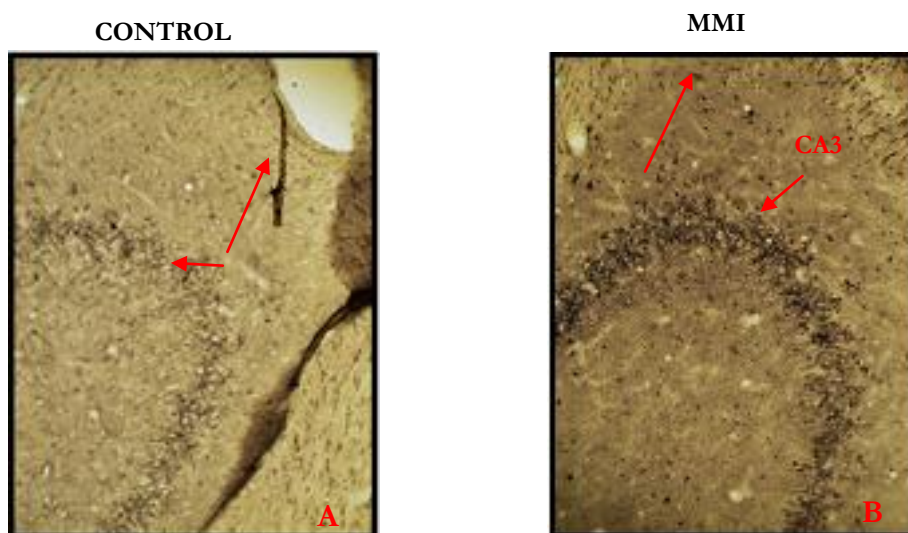


Figura N° 24. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo

La concentración de anticuerpo contra TrkB fue de 1/4000. La marcación de TrkB es de color café y corresponde al precipitado de DAB el cual fue visualizado por microscopia de luz en un microscopio Olympus BX41. (A) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas control, tomadas con lente de aumento de 10 X. (B) Fotografía representativa de la

región CA3 del hipocampo de ratas MMI, tomadas con lente de aumento de 10 X. Flechas indican ubicación de la zona CA3 y marcación de TrkB en los grupos experimentales.

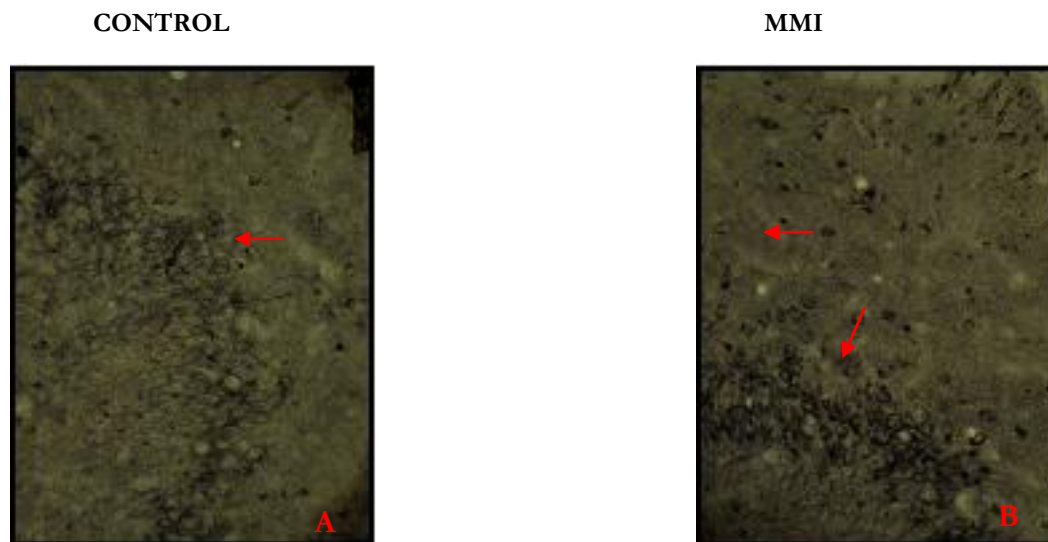


Figura N° 25. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo

Flechas muestran mayor presencia de neuronas fuera de la zona CA3 en MMI. La concentración de anticuerpo contra TrkB fue de 1/4000. (A) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas control tomadas con lente de aumento de 20 X. (B) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas MMI tomadas con lente de aumento de 20X. Flechas indican ubicación de la zona CA3 y marcación de TrkB en los grupos experimentales.

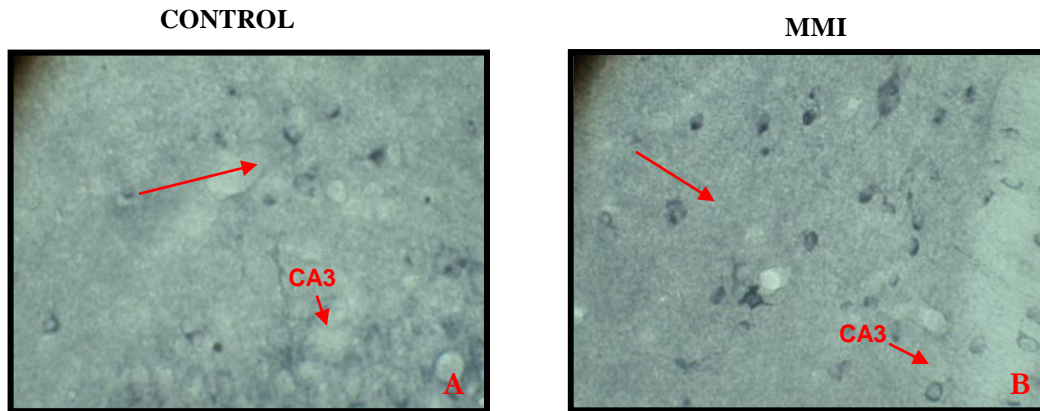


Figura N° 26. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo

Se realizó inmunohistoquímica contra TrkB en cortes coronales de cerebro de 30 μm de grosor. Flechas muestran mayor presencia de neuronas fuera de la zona CA3 en MMI. La concentración de anticuerpo contra TrkB fue de 1/4000. **(A)** Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas control tomadas con lente de aumento de 40 X. **(B)** Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas MMI tomadas con lente de aumento de 40 X. Flechas indican zona CA3 y marcación de TrkB en los grupos experimentales.

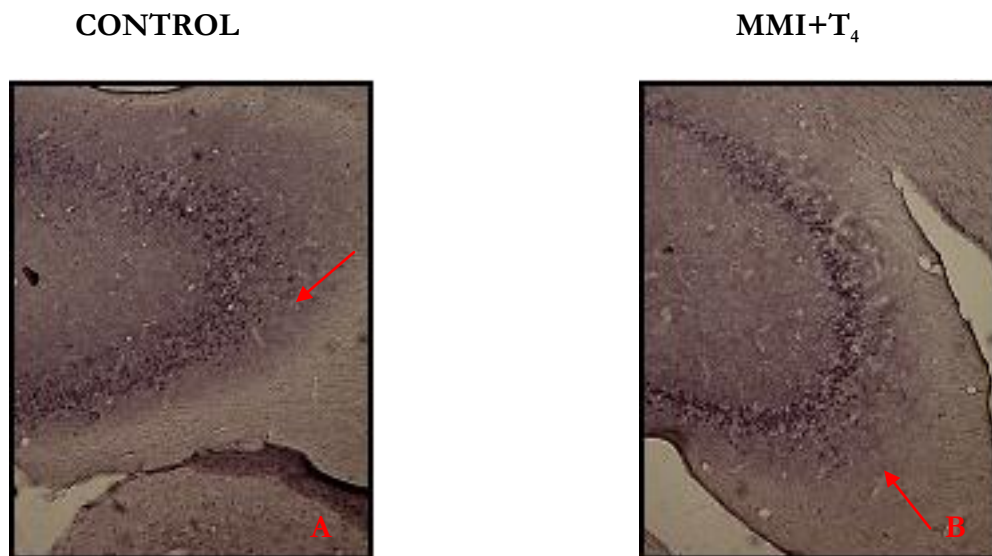


Figura N° 27. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo. Comparación cortes de ratas control y MMI+T₄

La concentración de anticuerpo contra TrkB utilizado fue de 1/4000. (A) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas control tomadas con lente de aumento de 10 X. (B) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas MMI + T₄ tomadas con lente de aumento de 10 X. Las flechas indican que se aprecia similitud en la marca de la zona CA3, con lo cual se muestra que se ha revertido el fenotipo experimental. Flechas indican zona CA3 y marcación de TrkB en los grupos experimentales.

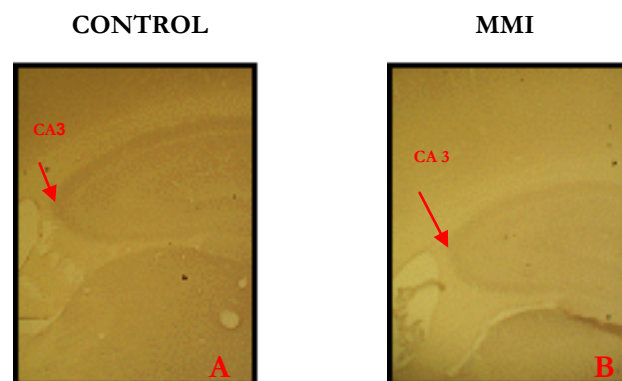


Figura N° 28. Inmunohistoquímica de TrkB en la región CA3 del hipocampo

La concentración de anticuerpo contra TrkB utilizado fue de 0 (cortes sin anticuerpo) (A) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas control tomadas con microscopía de luz en un microscopio Olympus BX41, con lente de aumento de 2,5 X. (B) Fotografía representativa de la región CA3 del hipocampo de ratas MMI tomadas con microscopía de luz en un microscopio Olympus BX41, con lente de aumento de 2,5 X.

VI.5. Distribución de NeuN en el hipocampo de ratas MMI

Los trabajos realizados por Lavado-Autric *et al.*, muestran que las ratas MMI presentan un aumento de neuronas con migración aberrante en la zona externa del CA3 del hipocampo. Por otro lado, nuestros resultados muestran que estos animales tienen un aumento de marcación para TrkB en la zona externa del CA3. Con la finalidad de determinar si la marcación de TrkB en esta zona se correlaciona con marcación neuronal, se procedió a realizar un análisis inmunohistoquímico de esta zona del cerebro con un anticuerpo específico para NeuN. NeuN es un marcador neural ya que es una proteína nuclear que se une al DNA y solamente se encuentra en núcleos neuronales. La detección de NeuN ha sido ampliamente utilizada para marcar neuronas (Online information center of Inmunohistochemistry, 2006).

Cortes coronales de cerebros provenientes de los mismos animales en que se analizó TrkB, fueron analizados para NeuN. Se procedió a analizar cuantitativamente esta marcación y para ello se trabajó con 3 experimentos por condición. Los cortes seleccionados corresponden aproximadamente al plato 19 del atlas de Paxinos y Watson (ver anexos). A continuación se

muestran las fotografías del hipocampo derecho del cerebro de las ratas en experimentación, que fueron analizados mediante inmunohistoquímica contra NeuN, en las que no se observaron cambios en el marcaje neuronal de NeuN en la zona CA3 entre nuestro control, MMI y MMI + T₄. Sin embargo, podemos señalar que la marca de TrkB se ubica en neuronas y no en glías, ya que este receptor está presente en la membrana plasmática de neuronas, en el soma, en dendritas y axones. Además, en nuestro estudio, existió un aumento en la expresión total de TrkB en el telencéfalo y de su contenido en la DPS de estas ratas, lo que se correlaciona con un aumento de neuronas ectópicas que marcaron para TrkB mediante IHQ, por lo tanto pensamos que la marca para TrkB si estaría en neuronas ectópicas, situación que no pudimos visualizar en IHQ realizada para NeuN, con n=1. Se seguirá analizando lo que sucede con este marcaje aumentando el n de experimentos realizados.

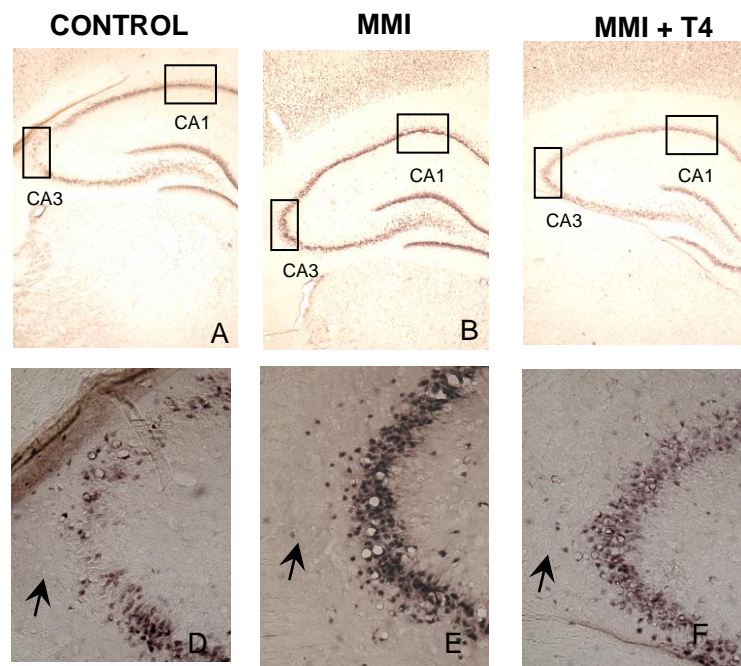


Figura N° 29. Determinación de la localización de la marcación para NeuN en la región CA3 del hipocampo

En la fotografía se muestra una inmunohistoquímica para localizar NeuN en cortes coronales de cerebro de 30 μm de grosor. La concentración de anticuerpo contra NeuN fue de 1/1000.

La marcación de NeuN es de color café y corresponde al precipitado de DAB el cual fue visualizado por microscopía de luz en un microscopio Olympus BX41. **(A-B-C)**: Fotografías representativas del hipocampo de ratas control, MMI y MMI+T₄ tomadas con lente de aumento 4 X. **(D-E-F)** Fotografías representativas de la región CA3 del hipocampo de ratas control, MMI y MMI+T₄ tomadas con lente de aumento 20 X. Las flechas indican que la migración neuronal no presentó diferencias significativas entre los fenotipos experimentales en estudio.

VII. DISCUSIÓN

VII.1. Diseño experimental

La hipotiroxinemia materna es una condición patológica que se caracteriza por una reducción plasmática específica de la T_4 (total y libre). Esta patología se produce principalmente por deficiencias de I⁻ en la dieta. En la literatura se han descrito dos modelos experimentales para inducir hipotiroxinemia a ratas preñadas. En la presente memoria, se evaluaron estos dos modelos para inducir la hipotiroxinemia a ratas gestantes. El primer modelo consistía básicamente en alimentar a la rata madre un mes antes y durante el desarrollo de la gestación con una dieta pobre en yodo. Este modelo provocó una hipotiroxinemia severa, que por los valores hormonales determinados, estuvo más cercana a la patología denominada hipotiroidismo. Entre los signos físicos se observó caída del pelaje, aletargamiento, alza de peso y lentitud en los movimientos. Sólo un 25% de las hembras con hipotiroxinemia severa lograron ser preñadas, de éstas, solamente un 16,6% logró dar a luz y un 8,3% conservó la camada. La ejecución de este modelo resultó ser muy complicada y con muy baja eficiencia de reproducción. Pensamos que la baja eficiencia en la reproducción se debe a la compleja metodología y por consecuencia al alto estrés al que fueron sometidos los animales durante la gestación más la severidad de la hipotiroxinemia. Este modelo, además, implicaba un mayor tiempo de trabajo y dedicación para lograr el fenotipo experimental. El segundo modelo experimental resultó ser más ventajoso ya que el manejo experimental fue más simple, generó en las ratas preñadas una hipotiroxinemia suave y sin alteraciones clínicas evidentes, además de no afectar significativamente su capacidad reproductiva. En consideración a lo anterior, fue el modelo utilizado para la obtención de los animales experimentales.

VII.2. Segundo modelo experimental y el efecto de MMI en la progenie

El MMI es un inhibidor específico de la tiroperoxidasa (TPO) y se ha demostrado que, al igual que una dieta baja en yodo, cuando es administrado por corto tiempo provoca hipotiroxinemia. La administración de MMI al 0,02% por cuatro días y el análisis de las hormonas tiroideas y de TSH demuestra que se indujo una hipotiroxinemia leve a las ratas gestantes. Estas características son importantes, ya que imitan en gran medida la situación

observada en un alto porcentaje de las mujeres embarazadas analizadas en países desarrollados (Lavado-Autric *et al.*, 2003).

La hipotiroxinemia materna es en la actualidad una importante preocupación para la salud pública debido a la alta frecuencia de mujeres con T_4 bajo el nivel normal y al consecuente daño neuronal provocado a la progenie. Esta situación ha resultado ser más dramática aun, debido a que los síntomas de la hipotiroxinemia (cansancio, sueño, lentitud) se asemejan al primer período de la gestación en la mujer. A esto se le suma que a la mujer embarazada no se analiza el estado de sus hormonas tiroideas, por lo que las mujeres hipotiroxinémicas pasan desapercibidas clínicamente. La solución a este problema es la detección temprana de los niveles de hormonas tiroideas en la mujer embarazada. En el caso de detectar alguna insuficiencia se procedería a suministrar la T_4 necesaria para reestablecer los niveles hormonales. Con el objetivo de apoyar la detección de hormonas tiroideas en la mujer embarazada se organizó esta memoria. Este trabajo representa el comienzo de las evidencias moleculares que demuestran los efectos provocados por la hipotiroxinemia materna sobre la neurona postsináptica de la sinapsis glutamatérgica del telencéfalo de la progenie en la rata. Esta información es relevante, ya que apoya la urgencia de la detección temprana de la hipotiroxinemia en la mujer embarazada. La detección temprana de la hipotiroxinemia tendría como consecuencia la disminución del porcentaje de niños con problemas de aprendizaje y concentración.

VII.3. Efecto de la hipotiroxinemia en la composición de la DPS

La DPS, como ya se ha señalado, corresponde a un complejo proteico funcional perteneciente a la región postsináptica solamente de la sinapsis neuronal excitatoria glutamatérgica. Su función se relaciona con recibir, regular y traducir la información del neurotransmisor a la neurona postsináptica. Por lo tanto, conocer la composición de las proteínas que conforman este organelo en la progenie proveniente de madres hipotiroxinémicas, es de gran importancia para entender los mecanismos moleculares que subyacen a las alteraciones cognitivas que persisten en estos animales. Entre las proteínas que componen la DPS nosotros seleccionamos algunas de ellas para la realización de esta memoria. El criterio de esta selección se basó en estudiar aquellas proteínas que directamente participan en procesos de plasticidad como son los receptores glutamatérgicos y los receptores para NT. En resumen, se observó que existen

diferencias significativas en TrkB tanto en H1 como en DPSs (figura 12); tanto NR1 (figura 13) como PSD95 (figura 15) sólo aumentaron en el H1.

Mediante la metodología de western blot se observó un marcado aumento para TrkB inducido por MMI, tanto en el H1 como en la DPS. Consistente con esta observación, se evidencia un aumento de TrkB en el área externa a la zona CA3 del hipocampo que es un área rica en vías nerviosas y pobre en neuronas (figura 24). Es decir, esta marca de TrkB se correlacionaría con el aumento de células ectópicas encontradas en ratas MMI. No solamente la hipotiroxinemia genera esta migración aberrante de neuronas en el hipocampo, también ha sido observada y descrita en patologías como la epilepsia. Para el receptor TrkB vemos que existe un aumento de marca contabilizada fuera de la zona CA3 del hipocampo, que corresponde a un 94% más de marca con respecto a los animales control. Además, observamos una reducción en el número de neuronas ectópicas en las ratas de MMI+T₄. Este resultado puede deberse a un exceso de tiroxina en estos animales con respecto al control. Debido a que TrkB aumenta en las DPSs, estos resultados permiten sugerir que la marca observada a través de inmunohistoquímica se localiza en neuronas y no en glías. Estos resultados no fueron confirmados por la inmunohistoquímica para NeuN, lo que puede deberse a que sólo se realizó un experimento. Interesantemente no se observó diferencias significativas en el contenido total de BDNF. Estos resultados sugieren que el aumento de TrkB podría deberse a un cambio compensatorio del sistema. Se sabe que un aumento en la actividad neuronal induce la traslocación de TrkB desde el citoplasma a la membrana plasmática (Meyer-Franke *et al.*, 1998). El modelo de hipotiroxinemia inducida a ratas preñadas en esta memoria demostró que la composición molecular de la DPS está afectada específicamente en el contenido de TrkB. Además, demostró que las neuronas ectópicas del hipocampo en las áreas del CA3 y CA1 (previamente descritas por otros autores) marcan positivo para TrkB. Por otro lado, se demostró que existe una alteración en la expresión total de NR1 y PSD95, a pesar de no existir un aumento de estas proteínas en la DPS, indicando que estas proteínas se están distribuyendo a otro compartimiento en la célula.

VII.4. Daño Cognitivo de las ratas MMI

Durante esta memoria se desarrollaron colaboraciones con otros científicos con el objetivo de evaluar el daño cognitivo a nivel fisiológico. En colaboración con el Dr. Sergio Mora de la

Universidad de Chile se realizaron test conductuales a nuestros distintos grupos experimentales. Los tests de aprendizaje y memoria que se realizaron fueron el de Actividad Motora Global, en el que se mide todo tipo de movimiento del animal; el de Locomoción, que detecta cuando el animal se está trasladando; el “Avoidance” Pasivo en que se mide si los ratones son capaces de memorizar una experiencia adversa y el test Water Morris Maze. Este test mide la memoria espacial la cual se encuentra asentada en el hipocampo. El test de “Water Morris Maze” se realiza en una piscina de unos 200 cm de diámetro donde se encuentra una plataforma. Se coloca la rata en el agua frente a la plataforma y se mide el tiempo en que se demora la rata en alcanzar la plataforma. Este test se repite durante 5 días y en cada día se cambia la posición de la rata con respecto a la plataforma. La plataforma estaba colocada en el cuadrante noroeste y los animales fueron colocados inicialmente en el este, luego sur, oeste, norte y la última otra vez desde el este. La rata para poder conseguir el objetivo debe de desarrollar una memoria espacial del estanque con la ubicación de la plataforma. Interesantemente, las ratas MMI fueron significativamente más lentas que las ratas normales en el test de “Water Morris Maze”. El hecho de que las ratas MMI tuviesen una memoria espacial deficiente es concordante con las alteraciones moleculares observadas en el telencéfalo (estructura anatómica que comprende al hipocampo) y con los resultados observados en los experimentos de potenciación a largo plazo (LTP). Los experimentos de LTP fueron realizados en colaboración con la Dra. Floria Pancetti, de la Universidad Católica del Norte, con sede en Coquimbo. En estos experimentos las ratas MMI no fueron capaces de generar LTP después de una estimulación tetánica de las vías CA3-CA1. Estos resultados explican en parte por qué las ratas MMI aprenden más lentamente (ver anexos). Además, se confirmó que la sinapsis de CA3 con CA1 existe en estos animales y que, por lo tanto, la alteración debe estar a nivel molecular. Nuestros resultados entregan evidencias de alteraciones moleculares en la expresión y contenido de proteínas fundamentales para la generación de LTP como es TrkB, PSD95 y NR1. A partir de estos resultados nosotros sugerimos que el daño y deterioro de la memoria espacial en el adulto, provocado por la ausencia de T_4 durante el comienzo de su gestación, modifica el contenido y expresión de proteínas claves como TrkB, NR1 y PSD95 para los mecanismos celulares que subyacen a la memoria espacial como es el LTP (figura 18). Proponemos que el aumento de TrkB en la DPS y el aumento de NR1 total pueden estar implicados en conexiones heterotópicas en el telencéfalo, lo que puede ser la base de un sistema neurológico poco eficiente. BDNF ha mostrado ejercer efectos agudos sobre la

transmisión sináptica glutamatérgica y GABAérgica. BDNF también ha mostrado jugar un rol importante en la plasticidad sináptica dependiente de actividad, incluyendo la potenciación a largo plazo (LTP). Uno de los blancos regulatorios de BDNF es el receptor de NMDA. En particular, BDNF potencia la actividad de NMDA en el hipocampo e incrementa las corrientes sinápticas mediadas por NMDA en la médula espinal (Kolb *et al.*, 2005). Por ende, se ha propuesto que BDNF participaría en procesos de plasticidad sináptica. En este estudio, sólo TrkB y no BDNF experimentó cambios significativos, lo cual podría estar señalando la alteración en la plasticidad sináptica ocurrida en los animales en experimentación.

VIII. CONCLUSIONES

1. El modelo de inducción de hipotiroxinemia materna mediante la administración de MMI a ratas gestantes utilizado en esta memoria, mostró ser un modelo consistente y de fácil estudio, el cual genera una hipotiroxinemia suave y subclínica.
2. Se observó un aumento significativo en la expresión total de NR1 y PSD95 en ratas a cuyas madres se les indujo hipotiroxinemia durante su gestación. No se observó cambios en el contenido de estas proteínas en la DPS de estos animales (MMI) con respecto al control.
3. TrkB aumentó tanto su expresión total en el telencéfalo (H1), como su contenido en la DPS de ratas a cuyas madres se les indujo hipotiroxinemia durante su gestación.
4. No hubo cambios significativos en la expresión de la NT BDNF; en la subunidad del receptor de NMDA, NR2 A/B; en la NT P75 y en el receptor para NT, TrkA, en el telencéfalo de ratas a cuyas madres se les indujo hipotiroxinemia durante su gestación.
5. Se observó un aumento significativo de la marca de TrkB ectópica en el área CA3 del hipocampo de ratas a cuyas madres se les indujo hipotiroxinemia durante su gestación.
6. ¿Qué significa lo expuesto anteriormente?. Podemos señalar que en nuestro estudio existieron cambios moleculares en la expresión y contenido de algunas proteínas que forman parte de la sinapsis glutamatérgica como la subunidad del receptor de NMDA, NR1; el receptor para BDNF, Trk B y en la proteína de andamio PSD 95. También el aumento de TrkB se correlaciona con un aumento de neuronas que se confirma con técnica de IHQ, por lo tanto pensamos que la marca de Trk B está localizado en neuronas ectópicas y que los cambios moleculares en la expresión de NR1, TrkB y PSD 95, podrían modificar la actividad sináptica del telencéfalo y esto en parte, da cuenta del daño cognitivo

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **ANDERSON, C.W.; MARIASH, C.N.; OPPENHEIMER, J.H.** 2000. Molecular actions of thyroid hormone. **In:** *The Thyroid: A Fundamental and Clinical Text*. Editorial Lippincott-Raven, Philadelphia, USA. p 174.
2. **ASOCIACIÓN EDUCAR.** 2005. Neuroplasticidad y redes hebbianas, las bases del aprendizaje. [En línea]. < <http://www.asociacioneducar.com.ar/articulos.html>>. [Consulta: 02-10-2005].
3. **AUSÓ, E.; LAVADO-AUTRIC, R.; CUEVAS, E.; ESCOBAR DEL REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G.; BERBEL, P.** 2004. A Moderate and Transient Deficiency of Maternal Thyroid Function at the Beginning of Fetal Neocortogenesis Alters Neuronal Migration. *Endocrinology*. 145,4037–4047.
4. **BARDE, Y.A.** 2002. Neurobiology: neurotrophin channels excitement. *Nature*. 17, 683-684.
5. **BATTAGLIA, G.; ARCELLI, P.; GRANATA, T.; SELVAGGIO, M.; ANDERMANN, F.; DUBEAU, F.; OLIVIER, A.; TAMPIERI, D.; VILLEMURE, J. G.; AVOLI, M.** 1996. Neuronal migration disorders and epilepsy: a morphological analysis of three surgically treated patients. *Epilepsy Res.* 26, 49-58.
6. **BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L.** 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
7. **CAMPUSANO, J.; ABARCA, J.; FORRAY, M.I.; GYSLING, K.; BUSTOS, G.** 2002. Modulation of dendritic release dopamine by metabotropic glutamate receptors in rat substantia nigra. *Biochemical Pharmacology* 63, 1343-1352.

8. **CARLIN, R.K.; GRAB, D.J.; COHEN, R.S.; SIEKEVITZ, P.** 1980. Isolation and characterization of postsynaptic densities from various brain regions: enrichment of different types of postsynaptic densities. *J. Cell Biol.* 86, 831-845.
9. **CELLERINO,A.; MAFFEI,L.; DOMENICI,L.** 1996. The distribution of brain derived neurotrophic factor and its receptor trkB in parvalbumin-containing neurons of the rat visual cortex. *Eur. J. Neurosci.* 8: 1190-1197.
10. **CUEVAS, E.; AUSÓ, E.; TELEFONT, M.; MORREALE DE ESCOBAR, G.; SOTELO, C.; BERBEL, P.** 2005. Transient maternal hypothyroxinemia at onset of corticogenesis alters tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *European Journal of Neuroscience.* 22, 541–551.
11. **DECHANT, G.** 2002. The neurotrophic receptor p75^{NTR}: novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nature Neuroscience* 5, 1131-1136.
12. **DELANGE, F.** 2001. Iodine deficiency as a cause of brain damage. *Postgrad. Med. J.* 77, 217-220.
13. **DINGLEDINE, R.; BORGES, K.; BOWIE, D.; TRAYNELIS, S. F.** 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev* 51, 7-61.
14. **DRAKE, C. T.;MILNER, T.A.; PATTERSON, S.L.** 1999. Ultrastructural localization of full-length trkB immunoreactivity in rat hippocampus suggests multiple roles in modulating activity-dependent synaptic plasticity. *J. Neuroscience.* 19, 8009-8026.
15. **FUNDACIÓN SÍNDROME DE DOWN: Down21.org.** 2005. Neurobiología. [En línea]. <http://www.down21.org/salud/neurobiologia/g_hipocampo.htm> [Consulta: 27-12-2005].
16. **GLIONER, D.** 1998. The systematic screening and management of hypothyroidism and hyperthyroidism during pregnancy. *TEM* 9, 403-411.

- 17. GOUTAN, E.; MARTÍ, E.; FERRER, I.** 1998. BDNF, and full length and truncated TrkB expression in the hippocampus of the rat following kainic acid excitotoxic damage. Evidence of complex time-dependent and cell-specific responses. *Molecular Brain Research* 59, 154-164.
- 18. GRIMES, M.L.; MIETTINEN, H.M.** 2003. Receptor tyrosine kinase and G-protein coupled receptor signaling and sorting within endosomes. *J Neurochem.* 84, 905-918.
- 19. HAAPASALO, A.** 2003. Localization and function of TrkB neurotrophin receptors isoforms in neuronal cells. Kuopio University PublicationsG. Doctoral Dissertation.
- 20. HIPOTIROIDISMO.** 2006. Esquema del eje hipotálamo-hipófisis y tiroides en el ser humano. [En línea]. <<http://www.tubotica.net/consejos/Hipotiroidismo-1.jpg>>. [Consulta: 10-04-2006].
- 21. HUANG, E.; REICHARDT, L.** 2001. Neurotrophins: Roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci.* 24, 677-736.
- 22. ICHITANI, Y.; OKAMURA, H.; MATSUMOTO, Y.; NAGATSU, I.; IBATA, Y.** 1991. Degeneration of the nigral dopamine neurons after 6-hydroxydopamine injection into the rat striatum. *Brain Res.* 549, 350-353.
- 23. KENNEDY, M. B.** 1993. The postsynaptic density. *Curr. Opin. Neurobiol.* 3, 732-737.
- 24. KOLB, J. E.; TRETTEL, J.; LEVINE, E. S.** 2005. BDNF enhancement of postsynaptic NMDA receptors is blocked by ethanol. *Synapse*, 55(1): 52-7.
- 25. LAEMMLI, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680-685.
- 26. LAVADO-AUTRIC, R.; AUSO, E.; GARCIA-VELASCO, J. V.; ARUFE, M DEL C.; ESCOBAR DEL REY, F.; BERBEL, P.; MORREALE DE ESCOBAR, G.** 2003.

Early maternal hypothyroxinemia alters histogenesis and cerebral cortex cytoarchitecture of the progeny. *J. Clin. Invest.* *111*, 1073-1082.

27. LEE, P. R.; BRADY, D.; KOENIG, J. I. 2003. Thyroid hormone regulation of N-methyl-D-aspartic acid receptor subunit mRNA expression in adult brain. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 87-92.

28. LUJÁN, R. 2004. Bases moleculares de la señalización neuronal. [En línea]. <<http://www.ciencia.cl/.../articulo/articulo5.html>> [Consulta: 10-04-2006].

29. MEYER-FRANKE, A., WILKINSON, G.A., KRUTTGEN, A., HU, M., MUNRO, E., HANSON, M.G., REICHARDT, L.F., BARRES, B.A. (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS Neurons. *Neuron.* *21*, 681-693.

30. MILLER, F.D.; KAPLAN, D.R. 2001. Neurotrophin signaling pathways regulating neuronal apoptosis. *Cell.Mol. Life Sci.* *58*: 1045-1053.

31. MORREALE DE ESCOBAR, G.; OBREGON, M. J.; ESCOBAR DEL REY, F. 2000. Is neuropsychological development related to maternal hypothyroidism or to maternal hypothyroxinemia?. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *85*, 3975-3987.

32. NEVEU, I.; ARENAS, E. 1996. Neurotrophins promote the survival and development of neurons in the cerebellum of hypothyroid rats in vivo. *J Cell Biol* *133*, 631-646.

33. NEUROSCIENCE ASSOCIATES. NSA. 2005. Perfusion protocol. [En línea]. <<http://www.neuroscienceassociates.com/perf-protocol.htm>>. [Consulta: 28-07-2005].

34. ONLINE INFORMATION CENTER OF INMUNOHISTOCHEMISTRY. 2006. NeuN Staining Protocol. [En línea].

<http://ihcworld.com/_protocols/antibody_protocols/neun_chemicon.htm>.[Consulta: 28-02-06].

35. OPPENHEIMER, J. H.; SCHWARTZ, H. L. 1997. Molecular basis of thyroid hormone-dependent brain development. *Endocr. Rev.* *18*, 462-475.

36. PAXINOS, G.; WATSON, C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic, 2nd Ed.

37. POMBO, P. M.; BARETTINO, D.; ESPLIGUERO, G.; METSIS, M.; IGLESIAS, T.; RODRÍGUEZ-PEÑA, A. 2000. Transcriptional repression of neurotrophin receptor TrkB by thyroid hormone in the developing rat brain. *J Biol Chem* *275*, 37510-37517.

38. POP, V. J.; KUIJPENS, J. L.; VAN BAAR, A. L.; VERKERK, G.; VAN SON, M. M.; DE VIJLDER, J. J.; VULSMA, T. 1999. Low maternal free thyroxine concentrations during early pregnancy are associated with impaired psychomotor development in infancy. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, *50*, 149-155.

39. PSICOACTIVA. 2005. Atlas visual del cerebro. [En línea]. <<http://www.psicoactiva.com/atlas/hipocamp.htm> >. [Consulta: 25-08-2005].

40. RAININ INSTRUMENTS. 2005. Peristaltic pump manual. [En línea]. <http://www.rainin.com/pdf/peristaltic_pump_manual.pdf>. [Consulta: 28-07-2005].

41. RANDALL, W.; JENSEN, O.; MANN, M.; PROVANCE, W.; MERCER, J.; KENNEY, M. 2000. Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J. Neuroscience* *20*, 4069-4080.

42. RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. 2003. Glutamate receptor function in learning and memory. *Behavioural Brain Research* *140*, 1-47.

43. **SIGMA-ALDRICH.** 2005. Bicinchoninic acid. [En línea]. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/QPBCA>>. [Consulta: 20-08-2005].
44. **SIGMA-ALDRICH.** 2006. Esquema de Neurotrofinas y sus ligandos. [En línea]. <www.sigmaaldrich.com/.../6460/Neurotrophins.jpg>. [Consulta: 10-04-2006].
45. **SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENT D.C.** 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150, 76-85.
46. **UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA. UTP. FACULTAD DE INGENIERÍA ELÉCTRICA.** 2005. Características principales de las redes neuronales. [En línea]. <<http://ohm.utp.edu.co/neuronales/Capitulo1/Images1/Fig124.gif>>. [Consulta: 02-10-2005].
47. **VAIDYA, V. A.; CASTRO, M. E.; PEI, Q.; SPRAKES, M. E.; GRAHAME-SMITH, D. G.** 2001. Influence of thyroid hormone on 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptor-mediated regulation of hippocampal BDNF mRNA expression. *Neuropharmacology* 40, 48-56.
48. **VULSMA, T.; GONS, M. H.; DE VIJLDER, J. J.** 1989. Maternal-fetal transfer of thyroxine in congenital hypothyroidism due to a total organification defect or thyroid agenesis. *N. Engl. J. Med.* 321, 13-16.
49. **WU, K.; XU, J-L.; SUEN, P-C.; LEVINE, E.; HUANG, Y-Y.; MOUNT, H.; LIN, S-Y.; BLACK, I.** 1996. Functional trkB neurotrophin receptors are intrinsic components of the adult brain postsynaptic density. *Mol Brain Res.* 43, 286-290.
50. **WYNEKEN, U.; SMALLA, K. H.; MARENGO, J. J.; SOTO, D.; DE LA CERDA, A.; TISCHMEYER, W.; GRIMM, R.; BOECKERS, T. M.; WOLF, G.; ORREGO, F.; GUNDELFINGER, E. D.** 2001. Kainate-induced seizures alter protein composition and N-

methyl-D-aspartate receptor function of rat forebrain postsynaptic densities. *Neuroscience*. *102*, 65-74.

51. YAN, Q.; RADEKE, M. J.; MATHESON, C. R.; TALVENHEIMO, J.; WELCHER, A. A.; FEINSTEIN, S. C. 1997. Immunocytochemical localization of TrkB in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* *378*, 135-157.

52. ZHANG, J.; LAZAR, M. A. 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* *62*, 439-466.

53. ZOELLER, R. T. 2003. Transplacental thyroxine and fetal brain development. *J. Clin. Invest.* *111*, 954-957.

IX. ANEXOS

IX.1. Análisis de la actividad motora, locomotora y de memoria visual-espacial

Los diferentes grupos experimentales de ratas fueron sometidos a una batería de tests para analizar su comportamiento y capacidades cognitivas. Los más relevantes de mencionar en la presente memoria fueron: **A) Actividad Motora Global** se realizó en el equipo de ANIMAL ACTIVITY MONITOR (Lafayette). El animal fue depositado en el compartimento del equipo y este por detección táctil registra cualquier movimiento del animal. El test tiene una duración de 30 minutos en los cuales se determina el movimiento cada 5 minutos. El n de cada grupo fue de 10 ratas control, de 9 ratas MMI y de 7 para ratas hijas de madres tratadas con MMI y T_4 . **B) La locomoción** del animal es analizada en el equipo OPTO-VARIMEX MINI de Columbus instruments. Este equipo está formado por una plataforma donde se depositó al animal y por celdas fotoeléctricas se sensaron los cambios en la intensidad de la luz producidos por el avance de la rata. El n experimental fue el mismo que para la actividad motora global. **C) Memoria visual-espacial** fue determinada en el test de “Morris Water Maze”. Este test se realizó en una piscina con agua de unos 200 cm. de diámetro, en la que se coloca una plataforma. Las ratas fueron colocadas en diferentes puntos cardinales de la piscina con respecto a la plataforma. La rata naturalmente nada en la piscina y se determinó el tiempo que demora en llegar a la plataforma. Cada día se realizaron 5 ensayos por rata. Este test se realizó durante 5 días. El número de ratas que participó en el experimento fue de 17 ratas hijas provenientes de madres hipotiroxinémicas o MMI, 16 controles y ratas hijas MMI+ T_4 fueron 17.

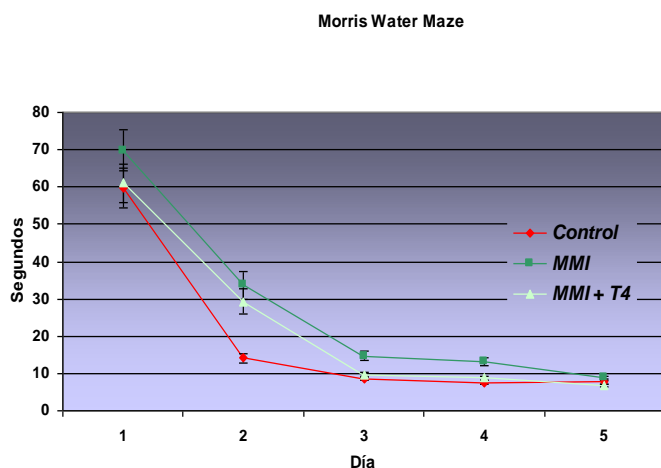


Figura N° 30. Morris water maze

Gráfico que muestra los segundos que demoró cada animal y los días de repeticiones del experimento. En rojo se grafica control, en verde MMI y en celeste MMI+ T_4 . La hipotiroxinemia materna causó daño cognitivo a su progenie. Este daño fue detectado ya que éstas ratas se demoraron más tiempo en aprender el mapa espacial y el camino a la plataforma que las ratas control.

En conclusión, según los resultados reportados por los colaboradores, en el test de actividad motora global, MMI es mayor que el control y se revierte con T_4 ; en el de locomoción, los resultados evidencian que los cambios no se deben a un déficit de T_4 , ya que no tiene significancia y en el test de “Morris Water Maze”, en el día 2 el resultado es significativo, pero con el tiempo MMI se iguala al control. Por lo tanto, los animales gestados por madres hipotiroxinémicas, se demoran más en aprender.

IX.2. Potenciación a largo plazo en el segundo modelo experimental

La Potenciación a Largo Plazo (LTP) se realizó con nuestros animales en estudio, en los cuales cortes transversales de hipocampo fueron preparados después de anestesiar al animal con éter y decapitarlo. Los cerebros fueron removidos rápidamente e inmersos en una solución a 0°C que contenía 212,7 mM sacarosa; 5 mM KCl; 1.25 mM NaH_2PO_4 ; 3 mM MgSO_4 ; 1 mM CaCl_2 ; 26 mM NaHCO_3 ; and 10 mM glucosa, pH 7,4. El hipocampo fue disectado en cortes transversales (400 μm de grosor) usando un vibrátomo (Modelo HA752, Campden Instruments, Leicester, England). Los cortes fueron transferidos a una cámara que contiene fluido de cerebro espinal artificial (ACSF) saturado con un 95% O_2 / 5% CO_2 y continuamente perfundidos a 2 ml/min. Potenciales excitatorios postsinápticos EPSPs fueron evocados por estimulación eléctrica entregada cada 15 seg a la vía colateral de Schaffer usando electrodos bipolares y registrado en el *stratum radiatum* (registro del EPSPs). Los electrodos de registros fueron micropipetas de vidrio (1-3 μM) rellenas con ACSF. En el comienzo de cada experimento, se realizaron curvas de estímulo/respuesta, incrementando la intensidad del estímulo para ajustar sobre el 50% de la máxima respuesta.

La razón fundamental que nos llevó a establecer esta colaboración yace en que la potenciación a largo plazo (LTP) ha sido propuesta como un mecanismo celular que subyace a procesos de aprendizaje. Procesos que están deteriorados en humanos nacidos de madres que padecieron de hipotiroxinemia durante el embarazo. Tanto las ratas experimentales y los controles fueron generadas en nuestro laboratorio. Una vez que las ratas cumplieron 60 días de edad fueron trasladadas al laboratorio de la Dra. Pancetti con la finalidad de realizar estímulos eléctricos para la inducción de LTP. Se realizaron curvas Input-Output. En la figura **31.1** se graficó el fEPSP (potencial excitatorio postsináptico de campo) en valores absolutos en función de la intensidad del estímulo.

El gráfico **B** corresponde a los valores del gráfico **A** normalizados por porcentaje. En ambos casos no se observa ninguna diferencia entre las tres condiciones (control, MMI y MMI + T₃) lo que indica que la excitabilidad del circuito intrahipocampal estudiado (vía CA3→CA1) no está afectada en las ratas tratadas con MMI o MMI+T₃. En la figura **31.2** se graficaron los resultados obtenidos de la inducción de LTP. El gráfico A muestra la amplitud de la respuesta de campo en función del tiempo. La flecha indica la aplicación del estímulo tetánico al tiempo 0. El gráfico B muestra el fEPSP normalizado en porcentaje en función del tiempo. Se puede observar que en ambos casos las ratas MMI y MMI + T₃ muestran deficiencias en la expresión de una LTP contundente. Todos los registros fueron hechos en el *stratum radiatum* de la vía CA3 → CA1. Los presentes resultados nos permitieron concluir que el tratamiento con MMI y MMI + T₃ pareció afectar un componente necesario para el establecimiento de la LTP, el cual no fue evidenciable en condiciones de actividad sináptica basal y no comprometió la excitabilidad global del sistema. Cabe señalar que en este estudio se utilizaron animales MMI+T₃, siendo éste fenotipo experimental similar a MMI, ya que no se suplementó T₄, sino que T₃, que no es la hormona que revierte el fenotipo MMI.

Figura 31.1

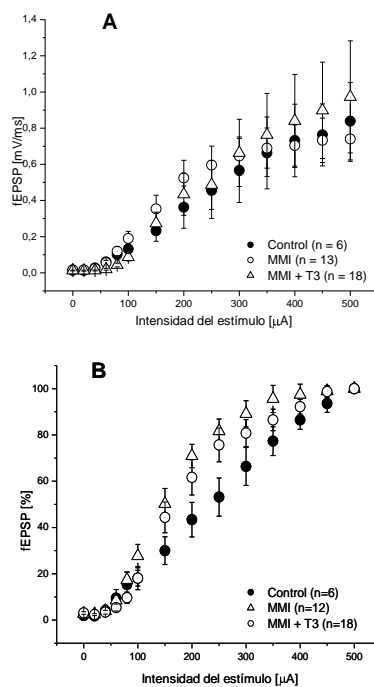
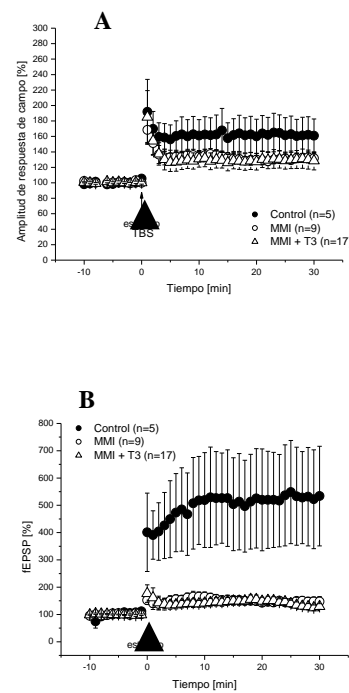


Figura 31.1 y 31.2 Gráfico de LTP

Se graficó en la figura 31.1 el fEPSP y en la 31.2 la inducción de LTP.

Figura 31.2



IX.3. Equipo utilizado en IHQ: bomba de perfusión

Otro de los elementos que se utilizaron para el desarrollo de esta memoria fue la bomba peristáltica Dynamax, modelo RP-1 y de marca Rainin. Ésta se utilizó para realizar la perfusión de las ratas, proceso previo a la realización de la técnica de IHQ.

La bomba Dynamax RP-1, está expresamente diseñada para la transferencia de fluidos, la cabeza rotatoria tiene diez rodillos de acero inoxidable. Como la cabeza gira, cinco de los rodillos presionan la tubería contra el brazo de compresión, produciendo el flujo por la acción peristáltica. Con esos cinco rodillos en contacto con la tubería, se asegura la pulsación baja, el flujo liso y la alta presión. La velocidad de la bomba es en revoluciones por minuto y la velocidad de bomba y la dirección de rotación son controladas por un teclado numérico (Rainin instruments, 2005).



Figura N° 32. Dynamax RP-1 Peristaltic Pump

IX.4. Sistema de inmunodetección para BDNF (promega)

3.1. Preparación de la muestra.

El kit puede ser usado para cuantificar BDNF en sobrenadantes de cultivos celulares, plasma, suero, orina y extractos de tejidos. Para ello se deben guardar las muestras congeladas a -20 °C antes de su uso. Hay que evitar congelar y descongelar muchas veces las muestras a utilizar. Antes de usar las muestras se debe remover las partículas de las ellas por centrifugación.

- 1) Diluir la muestra (en este caso H1) agregando 4 volúmenes de DPBS (Winkler).
- 2) Agregar un μl de HCl 1N por cada 50 μl de muestra diluida. Verificar que el pH es menor a 3.
- 3) Mezclar e incubar por 15 min a T° ambiente.
- 4) Neutralizar agregando 1 μl de NaOH por cada 50 μl de muestra. Verificar que el pH es aproximadamente 7,6.

3.2. Protección de la placa

En un tubo de 50 ml agregar exactamente 10 μl de anticuerpo monoclonal contra BDNF en 10 ml de tampón carbonato (Winkler), para preparar suficiente reactivo para 96 pocillos. Agitar en forma circular cuidando de no crear exceso de burbujas. Agregar 100 μl por pocillo de la placa de ELISA. Sellar la placa con su respectiva tapa y dejar incubando toda la noche a 4 °C (en refrigeración).

3.3. Preparación de la solución de bloqueo

Cada placa requiere aproximadamente 53 ml de solución de bloqueo para ser usada el segundo día. Preparar la solución de bloqueo mezclando 42,4 ml de agua desionizada con 10,6 ml de solución de bloqueo 5X. Mezclar suave y completamente por inversión al momento de usar.

3.4. Bloqueo de la placa

- 1) Sacar la placa protegida del refrigerador. Eliminar el contenido de los pocillos invirtiendo la placa 3 veces sobre un papel absorbente. Vigorosamente lavar todos los pocillos con TBST. Llenar cada pocillo con TBST, botar el contenido e invierta 3 veces sobre un papel absorbente. Agregar 200 μl de solución de bloqueo a cada pocillo, cuidar de no tocar ni rayar la superficie de los pocillos donde esta unido el anticuerpo.
- 2) Incubar la placa a temperatura ambiente por una hora sin agitación.

3.5. Preparación de la curva estándar para BDNF

El estándar de BDNF que trae el kit entrega una curva estándar lineal entre 7,8 y 500 pg/ml. Usar sólo valores que estén dentro del rango lineal de esta curva para determinar la concentración de las muestras.

El estándar de BDNF viene a una concentración de 1 µg/ml. Diluir exactamente el estándar de BDNF a una concentración de 1:2000 en solución de bloqueo para llegar a una concentración de 500 pg/ml. Por ejemplo, agregar 10 µl del estándar a 390 µl de solución de bloqueo (dilución 1:40). Luego agregar 10 µl de esta solución a 490 µl de solución de bloqueo (dilución 1:50). Este protocolo da como resultado una dilución del estándar de 1:2000.

- 1) Después del bloqueo de la placa remover el contenido por inversión, retirar todo el resto de líquido invirtiendo 3 veces sobre un papel absorbente y lavar una vez con TBST. Marcar 2 columnas de pocillos (16 pocillos) para la curva estándar. Para preparar la curva estándar dentro de la placa agregar 100 µl de solución de bloqueo a los pocillos de la fila B hasta la fila H, en las dos columnas para la curva estándar.
- 2) Agregar 200 µl del estándar de BDNF diluido (500 pg/ml) al primer pocillo de cada columna de la curva estándar (fila A).
- 3) Inmediatamente realizar diluciones seriadas 1:2 (100 µl por pocillo) bajando por la placa en las columnas para la curva estándar. En la última fila de pocillos no agregar BDNF. La concentración final dentro de la placa (en duplicado) será de 0-500 pg/ml (ver figura).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	pg/ml
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	500
B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	250
C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	125
D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	62.5
E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	31.3
F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	15.6
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	7.8
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	0

Figura N° 33. Placa de Elisa

3.6. Adición de la muestra

Se recomienda partir con una dilución de 1:4 para cada muestra y preparar diluciones seriadas 1:2 en las columnas de la placa de ELISA.

- 1) Después de preparar la curva estándar, agregar 100 μ l de las muestras a los pocillos correspondientes.
- 2) Sellar la placa con su respectiva tapa e incubar por 2 horas a T° ambiente con agitación (400 \pm 100 RPM).
- 3) Lavar la placa 5 veces con TBST.

3.7. Adición del anticuerpo policlonal contra BDNF humano

- 1) En un tubo de 15 ml agregar 20 μ l del anticuerpo policlonal a 9,98 μ l de solución de bloqueo (dilución 1:500), reactivo suficiente para una placa de 96 pocillos. Agitar en forma circular cuidando no crear exceso de burbujas. Agregue 100 μ l del anticuerpo policlonal anti-BDNF humano a cada pocillo, cuidando de no tocar o rayar la superficie de los pocillos.
- 2) Selle la placa con su respectiva tapa e incubar 2 horas a T° ambiente con agitación (400 \pm 100 RPM).
- 3) Lavar la placa 5 veces con TBST.

3.8. Adición de Anti-Ig Y conjugada con peroxidasa de rabanito

- 1) En un tubo de 50 ml agregar exactamente 50 μ l de Anti-IgY a 9,95 ml de solución de bloqueo (dilución 1:2000), reactivo suficiente para una placa de 96 pocillos. Agitar en forma circular cuidando no crear exceso de burbujas. Agregue 100 μ l de Anti-IgY a cada pocillo, cuidando de no tocar o rayar la superficie de los pocillos.
- 2) Incubar 1 hora a temperatura con agitación (400 \pm 100 RPM).
Nota: Durante la agitación lleve la solución de TMB(Winkler) a T° ambiente.
- 3) Lavar la placa 5 veces con TBST.

3.9. Desarrollo del color

- 1) Agregar 100 μ l de TMB a T° ambiente a cada pocillo.

- 2) Incubar a T° ambiente con agitación por 10 minutos. Aparecerá un color azul en los pocillos.
- 3) Detener la reacción agregando 100 µl de HCl 1N a los pocillos en el mismo orden en que el sustrato fue agregado en el punto 2. El color azul debe cambiar a amarillo por la acidificación. Tener cuidado de no crear burbujas.
- 4) Registrar la absorbancia a 450 nm dentro de 30 minutos de la detención de la reacción. (ver curva teórica).

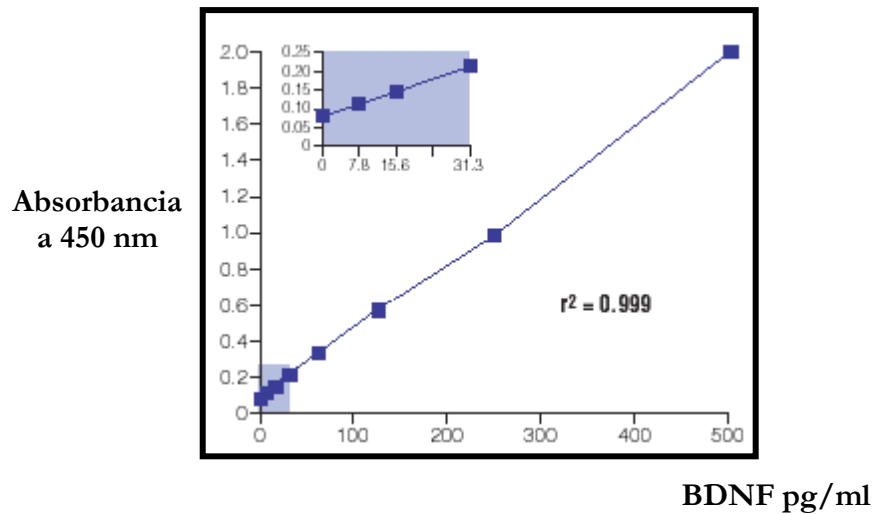


Figura N° 34. Curva de Absorbancia a 450 nm

X.5. Esquema del atlas de Paxinos y Watson utilizado en este estudio

En la figura 35 se muestra un dibujo completo del hipocampo de rata, correspondiente a la coordenada del plato 19 del cerebro murino, en donde se graficaron las distintas zonas de éste. Además, para un mejor entendimiento, se incluyó una fotografía (figura 36) de las abreviaturas de dicho dibujo.

En esta memoria tomamos como referencia anatómica del cerebro de la rata, las estructuras que se muestran en la figura 35.



Figura N° 35. Fotografía del plato 19. Atlas de Paxinos y Watson, 1986.

Plate 19

alv Alveus	iml Internal Medullary Lamina
Arc Arcuate Nucleus (Hypothalamus)	In Insular Area (Cortex)
BLA Basolateral Nucleus of the Amygdala	LA Lateral Nucleus of the Amygdala
BMA Basomedial Nucleus of the Amygdala	LD Lateral Dorsal Nucleus (Thalamus)
CA₁ Hippocampal Area CA ₁ (Ammon's Horn)	LHA Lateral Hypothalamic Area
CA₃ Hippocampal Area CA ₃ (Ammon's Horn)	Ma Motor Agranular Cortical Area
cc Corpus Callosum	MD Mediodorsal Nucleus (Thalamus)
CdP Caudoputamen	MeA_p Medial Nucleus of the Amygdala (posterior)
CeA Central Nucleus of the Amygdala	mfb Medial Forebrain Bundle
Cl Claustrum	mt Mammillothalamic Tract
cl Central Lateral Nucleus (Thalamus)	ot Optic Tract
cm Central Medial Nucleus (Thalamus)	Pa Paraventricular Nucleus (Thalamus)
cng Cingulum Bundle	Pam Periamygdaloid Cortex
DG Dentate Gyrus	Pc Paracentral Nucleus (Thalamus)
DMh_p Dorsomedial Nucleus (posterior) (Hypothalamus)	pc Posterior Commissure
ec External Capsule	PH Posterior Hypothalamic Nucleus
eml External Medullary Lamina	Pir Piriform Area (Cortex)
EP Endopiriform Nucleus	PL Posterior Limbic Area (Cortex)
FC Fasciola Cinerea	Po Posterior Group (Thalamus)
fr Fasciculus Retroflexus	R Reticular Nucleus (Thalamus)
Ge Nucleus Gelatinosus (Nucleus Submedius) (Thalamus)	Re Nucleus Reuniens (Thalamus)
Hb_l Habenula Nucleus (lateral) (Thalamus)	rf Rhinal Fissure
Hb_m Habenula Nucleus (medial) (Thalamus)	sm Stria Medullaris
hf Hippocampal Fissure	SomS Somatosensory Cortex
ic Internal Capsule	st Stria Terminalis
IG Induseum Griseum	V3 Third Ventricle
	VB Ventrobasal Nuclear Complex (Thalamus)
	VL Ventrolateral Nucleus (Thalamus)
	VM Ventromedial Nucleus (Thalamus)
	VMh Ventromedial Nucleus (Hypothalamus)
	ZI Zona Incerta

Figura N°36. Detalle de abreviaturas del plato 19.