

03072

16

24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICACION DE LOS RNAs MENSAJEROS DE LAS
CONVERTASAS PC1 Y PC2 EN LAS NEURONAS
TRRHERGICAS DEL NPV DEL HIPOTALAMO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA LA BIOLOGA
EDITH SANCHEZ JARAMILLO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUERNAVACA, MOR. .

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICACION DE LOS RNAs MENSAJEROS DE LAS
CONVERTASAS PC1 Y PC2 EN LAS NEURONAS
TRHÉRGICAS DEL NPV DEL HIPOTALAMO DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA
PRESENTA LA BIOLOGA
EDITH SANCHEZ JARAMILLO

Este trabajo fué realizado en el laboratorio de
Neuroendocrinología Molecular
bajo la dirección de la Dra. Rosa María Uribe Villegas
y se financió parcialmente con el Donativo de la
DGAPA/UNAM IN-206094.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Rosa Maria Uribe Villegas

COMITE TUTORIAL

Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Dr. Luis F. Covarrubias Robles

Dra. Carmen Beltrán Nuñez

Dra. Rosa María Uribe Villegas

M. en C. Ma. Consuelo García Rodríguez

JURADO DE EXAMEN

Presidente: Dra. Susana López Charreton

Vocal: Dr. Osvaldo Vindrola Asti

Secretario: Dra. Rosa María Uribe Villegas

Suplente: Dr. Félix Recillas Targa

Suplente: Dr. F. Arturo Liévano Mendoza

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Ma. Uribe Villegas por su ayuda
e interés en mi preparación

A los Dres. Jean Louis Charli Casalonga y Patricia Joseph-Bravo
por el apoyo brindado en la realización de este trabajo

A la Q.F.B Claudia Morales Chapa y al Dr. Gabriel Corkidi Blanco
por su participación en la realización de este trabajo

A Manuel Villa y a la Sra. Elena Martel
por su apoyo técnico

A mis compañeros del laboratorio

A mis padres y hermanos

A mi compañero

A mis amigos Toto, Lore, Toño,
Violeta, Mariela, Ecota
Lydia, Fide

Al bebé de Lyz

A mis tías Teo, Catis y familia

A Chuy Rivero de Mtz.

INDICE

ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
1. Generalidades	
1. 1 Características de algunos precursores peptídicos	
1. 2 Biosíntesis de precursores peptídicos	7
1. 3 Procesamiento de los precursores peptídicos	
2. Enzimas involucradas en el procesamiento de los precursores peptídicos	9
2. 1 Convertasas	
2. 2 Carboxipeptidasas, amidasas y ciclasas	14
3. Hormona liberadora de la tirotropina (TRH)	15
3. 1 Características generales	
3. 2 Procesamiento del precursor	16
3. 3 Cambios relacionados con la síntesis y procesamiento del precursor	17
JUSTIFICACION	17
OBJETIVOS	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	
MATERIALES Y METODOS	19
1. Animales	
2. Material y H ₂ O	
3. Marcado de sondas	
3. 1 Oligonucleótidos marcados con γ - ATP [32P] ó α - dATP [35S]	
3. 2 Transcripción <i>in vitro</i> utilizando isótopos radiactivos	20
3. 3 Transcripción <i>in vitro</i> empleando UTP- digoxigenina	21
4. Hibridaciones <i>in situ</i>	22
4. 1 Preparación de los tejidos	
4. 2 Hibridación <i>in situ</i> empleando oligonucleótidos [35S]	
4. 3 Hibridación <i>in situ</i> empleando transcritos [33P] o [35S] UTP	23
4. 4 Hibridación <i>in situ</i> empleando doble marcaje	24
5. Cuantificación celular mediante el uso de un sistema analizador de imágenes	25
RESULTADOS	27
1. Detección de los RNAs mensajeros de TRH, PC1, PC2 y CRF por hibridación <i>in situ</i> empleando oligonucleótidos	
1. 1 Oligonucleótidos sintéticos	
1. 2 Marcado de los oligos por terminal transferasa	
1. 3 Análisis por northern blot de la señal de PC1	28
1. 4 Hibridaciones <i>in situ</i>	30
2. Hibridaciones <i>in situ</i> empleando transcritos de cRNA	34

2. 1 Transcripciones <i>in vitro</i> para los cRNAs de TRH, PC1 y PC2	
3. Detección de los RNAs mensajeros de TRH -TRH, TRH -PC1, TRH -PC2 ó TRH -CRF en cortes de cerebro contiguos	36
4. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en neuronas TRHérgicas del NPV empleando un ensayo de doble hibridación	44
4. 1 Detección de color con el transcrito de TRH.dig	
4. 2 Ensayos de doble hibridación	45
DISCUSION	50
PERSPECTIVAS	54
REFERENCIAS	55
Anexo 1	62
Anexo 2	
Anexo 3	63
Anexo 4	65

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adrenocorticotropina
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
cDNA	DNA complementario
CPE	Carboxipeptidasa E
CRF	Factor liberador de corticotropina
CRIF	Factor inhibidor de la liberación de corticotropina
cRNA	RNA complementario
DAB	Diaminobenzidina
DIG	Digoxigenina
ECT	Tratamientos electroconvulsivos
ELH	Hormona de la ovoposición
ESM	Error estándar de la media
KDa	Kilodaltones
α -MSH	Hormona estimuladora de los melanocitos
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NPV	Núcleo paraventricular
NSO	Núcleo supraóptico
PAM	peptidil glicil α monooxigenasa
PC	Proteína convertasa
POMC	Propiomelanocortina
PSS	Precursor de somatostatina
PRL	Prolactina
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
SRP	Partícula de reconocimiento de la señal
SSR	Receptor de la partícula de reconocimiento
TGN	Trans Golgi Network
TRH	Hormona liberadora de la tirotrópina
TSH	Hormona estimuladora de la tirotrópina

RESUMEN

Uno de los sistemas TRHérgicos cuyo papel fisiológico es bien conocido, es el que proyecta del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo hasta la eminencia media, desde donde se libera el TRH hacia su blanco: lactótrofos y tirótrofos de la adenohipófisis que liberan prolactina (PRL) y tirotropina (TSH) respectivamente.

Estas hormonas viajan a su vez por la sangre periférica para llegar hasta sus órganos blanco, que en el caso de la TSH es la glándula tiroidea, donde estimula la liberación de hormonas tiroideas y en el caso de la PRL la glándula mamaria donde se llevan a cabo diversos procesos relacionados con la lactancia.

Durante de la biosíntesis del TRH existen diferentes etapas que son susceptibles de regulación (transcripción, traducción, procesamiento del precursor y empaquetamiento de los péptidos activos entre otros). Nuestro grupo de investigación está interesado en determinar si existe regulación en el procesamiento del precursor del TRH; uno de los objetivos consiste en conocer cuales son las enzimas involucradas en la hidrólisis de los enlaces peptídicos que unen a los pares de aminoácidos (aa) básicos que flanquean a las secuencias codificadoras para TRH. Como un primer acercamiento, se decidió investigar si los RNAs mensajeros de 2 enzimas procesadoras (las convertasas PC1 y PC2) colocalizan con el RNAm de TRH en neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo de la rata. Se iniciaron los ensayos de colocalización con PC1 o PC2 porque la literatura describe que su distribución se limita a tejidos endócrinos y neuroendócrinos (49) y además porque teníamos antecedentes de que *in vitro* estas enzimas son capaces de procesar al precursor de TRH (89-91).

Los ensayos de colocalización se realizaron a través de hibridaciones *in situ* para determinar la presencia de los RNAs mensajeros en el tejido mencionado. Para ello se emplearon dos estrategias, una de las cuales consistió en determinar la presencia de los RNAs mensajeros (TRH y PC1 ó TRH y PC2) en cortes de cerebro contiguos de 10 micras de grosor a lo largo del NPV. La segunda estrategia consistió en implementar los ensayos de doble hibridación empleando sondas acopladas a digoxigenina (cRNA de TRH Dig) o radiactivas (cRNA de PC1 o de PC2 con UTP [³⁵S] o UTP [³³P]) en una misma rebanada.

El análisis de los resultados permitió concluir que en el NPV del hipotálamo existe colocalización de los RNAs mensajeros de TRH y de PC2 en aproximadamente el 60% de las neuronas TRHérgicas y colocalización del RNAm de TRH con el RNAm de PC1 en aproximadamente el 40% de la población de neuronas TRHérgicas.

INTRODUCCION

1. Generalidades

Los neuropéptidos se sintetizan a partir de proteínas precursoras de alto peso molecular que se translocan al lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) para dar inicio a una serie de eventos postraduccionales, que darán como resultado a los péptidos biológicamente activos (1).

La caracterización de diversos precursores peptídicos a nivel de su secuencia aminoácida ha mostrado que poseen las siguientes características en común:

Son proteínas de alto peso molecular, poseen un péptido señal que las dirige al lumen del RER, dan origen a uno o varios péptidos activos que pueden o no estar relacionados entre sí y contienen secuencias peptídicas flanqueadas por uno a cuatro aminoácidos básicos (lisina y/o arginina) tanto en el amino como en el carboxilo terminal, siendo los pares de aminoácidos básicos los más frecuentes.

1.1 Características de algunos precursores peptídicos

La identificación de los mecanismos de síntesis del factor α de apareamiento (α mating) en levadura sugiere que el procesamiento de los precursores peptídicos es un evento conservado en la evolución (2). El arreglo de los precursores peptídicos es muy variado (figura 1); en los casos más simples como el de la prolactina, la maduración del péptido ocurre desde la entrada del precursor al lumen del RER cuando éste adquiere la formación de puentes disulfuro y el plegado de la proteína (3). Algunas veces ocurre una cascada de modificaciones más compleja como en el caso de la insulina que requiere de 2 cortes endoproteolíticos en residuos dibásicos; en este precursor, la unión del péptido C juega un papel estructural transitorio, ya que promueve la conformación de las cadenas A y B de la hormona madura para la formación de 3 puentes disulfuro (4). Algunos precursores codifican para varias copias de un mismo péptido. El caso más extremo es el del precursor de FMRF de *Aplysia californica* que codifica para 28 copias del tetrapéptido FMRFamida y para una copia de un péptido relacionado FLRFamida (5). Otros ejemplos de precursores que codifican para varias copias de un mismo péptido incluyen al precursor del factor α de levadura que genera 4 copias del péptido activo (2) y al precursor del TRH en la rata que genera 5 copias del péptido activo (6).

El procesamiento diferencial de los precursores en las distintas zonas, ha sido demostrado para algunos de los precursores peptídicos (7). El precursor de la proopiomelanocortina (POMC) de mamíferos se procesa de manera alterna en los lobulillos anterior e intermedio de la glándula hipófisis para generar diferentes péptidos en estos tejidos.

El precursor de POMC, también se caracteriza por contener dentro de su secuencia a varios péptidos que no están relacionados entre sí (8). Otro ejemplo de precursores que codifican para péptidos con actividades distintas es el del precursor de la "egg laying hormone" (ELH) de *Aplysia californica*, que codifica por lo menos para 4 péptidos fisiológicamente activos; tres se expresan principalmente en la glándula exócrina atrial y el péptido restante se expresa en las células de la bolsa y en una población pequeña de neuronas que se encuentran dispersas a través del sistema nervioso central (SNC) (9).

1. 2 Biosíntesis de precursores peptídicos

La síntesis de los precursores inicia en el núcleo celular con la activación de genes específicos que son transcritos por la RNA polimerasa II para generar moléculas de RNA primario que darán origen al RNA mensajero -RNAm- (10-12).

El RNA primario sufre varias modificaciones antes de salir del núcleo como RNAm (13); en el extremo 5' se metilan sus primeros nucleótidos formando un casquete o CAP (14) que facilitará la unión del RNAm al ribosoma. En el extremo 3' se le añaden una serie de adeninas que forman la cola de PolyA, la cual se ha asociado con el transporte del RNAm del núcleo al citoplasma y con la estabilidad del RNAm (15). Además ocurre otra modificación conocida con el nombre de "splicing" del RNA, que permite la eliminación de las secuencias intrónicas y la ligación de los exones mediante el uso de un complejo enzimático compuesto de pequeños RNAs y proteínas (16,17).

El RNAm se transporta del núcleo al citoplasma y ahí se une a los ribosomas del citosol, en donde se lleva a cabo la traducción (14). Los primeros codones que se traducen corresponden, en la mayoría de los casos, a una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos conocida como péptido señal (18). El péptido señal interacciona con una partícula ribonucleoproteica (SRP) y este complejo es reconocido por su receptor (SSR) en la membrana del RER; esta asociación sirve como punto de anclaje para introducir al lumen del RER de manera cotraduccional a la proteína naciente (19). Cuando la proteína naciente empieza a internalizarse, el péptido señal es removido por una peptidasa que se localiza en la membrana del RER; al alcanzar el lumen del RER, se lleva a cabo la formación de puentes disulfuro, el doblamiento de la cadena peptídica y la glicosilación de uno o varios residuos de asparaginas (glicosilación del tipo N-acetil amina), en caso de que el precursor tenga las secuencias consenso (20). Los precursores que salen del RER lo hacen a través de pequeñas vesículas de transporte que se fusionan con la membrana del cis Golgi; en este compartimento pueden ocurrir modificaciones adicionales de los residuos glicosilados para generar estructuras complejas ó glicosilación de uno o varios residuos de serina o de treonina (glicosilación llamada del tipo O por la unión del azúcar al grupo OH del aminoácido), fosforilaciones, acetilaciones ó sulfataciones que parecen estabilizar al precursor (21).

1. 3 Procesamiento de los precursores peptídicos

La generación de péptidos fisiológicamente activos ocurre por la acción secuencial de una variedad de actividades enzimáticas encontradas dentro de la vía de secreción (figura 2). Inicialmente ocurren cortes endoproteolíticos en el C-terminal del par de los residuos básicos que flanquean a los péptidos, por la acción de unas enzimas denominadas convertasas. Los residuos dibásicos son blanco de otra enzima, una exoproteasa conocida como carboxipeptidasa B, H ó E, que a menudo genera péptidos maduros. Los péptidos que tienen una glicina en el C-terminal son sustrato de la enzima peptidil-glicil α -monooxigenasa (PAM) que genera péptidos amidados. Adicional a esta modificación, los péptidos que presentan una glutamina en el N-terminal podrán ser sustrato de otra enzima, la glutaminil ciclaza, que como su nombre lo dice, cicliza a la glutamina de dicha terminal. Las enzimas involucradas en estos procesos se describen más adelante.

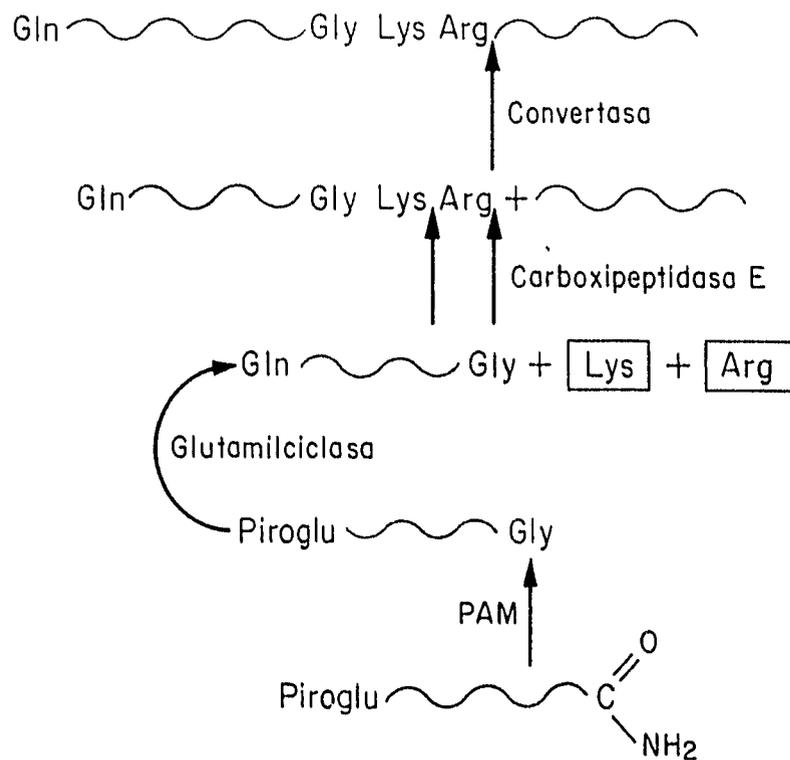


Fig 2 Eventos involucrados en la maduración de un péptido modificado en sus terminales amino y carboxilo a partir de su precursor.

El procesamiento proteolítico de los precursores peptídicos a sus formas maduras es un evento que se ha asociado con las etapas finales de la vía de secreción, en la red del "trans Golgi network" (TGN) y principalmente con la acumulación de moléculas precursoras en los gránulos de secreción (22). Un ejemplo de procesamiento proteolítico en el trans Golgi se ha descrito para el ya mencionado precursor ELH del molusco *Aplysia californica*; en el TGN de las células neuronales, el precursor de ELH sufre un corte endoproteolítico que genera los productos intermediarios del amino y del carboxilo terminal, los cuales son empaquetados en diferentes vesículas de secreción y dirigidos a lugares distintos dentro de la neurona (23). Este es uno de los primeros ejemplos de compartimentalización diferencial de los productos generados a partir de un mismo precursor.

Los precursores peptídicos que salen del TGN viajan a través de vesículas de secreción -también conocidas como gránulos por la densa apariencia que presentan al microscopio electrónico- junto con las enzimas que generarán a los péptidos activos. Un sistema de microtúbulos del citoesqueleto conduce a los gránulos a través del axón hacia las terminales nerviosas, en donde son almacenados hasta que una señal apropiada provoque la fusión de la membrana del gránulo con la membrana plasmática para liberar a los péptidos.

2. Enzimas involucradas en el procesamiento de los precursores peptídicos

2.1 Convertasas

Caracterización

La caracterización molecular de la enzima responsable del procesamiento de los sitios dibásicos de precursores peptídicos de levadura (KEX2), trajo como consecuencia la búsqueda de los genes homólogos en mamíferos.

Estudios de complementación con el cDNA de KEX2 en células de levadura que carecen de la enzima (24) así como la expresión de precursores peptídicos de mamífero en levadura (25,26) y coexpresión de KEX2 en líneas celulares de mamíferos (27,28) permitieron denominarla como una convertasa (29,30).

La enzima KEX2 pertenece a la familia de las serin proteasas y es una enzima cuya actividad se encuentra asociada con la membrana dado, que presenta un dominio transmembranal hidrofóbico en el C-terminal de la secuencia de aminoácidos predicha; también presenta un sitio dibásico interno que es cortado para generar una forma soluble, la cual se secreta cuando es expresada en cultivos de células heterólogas (30).

A partir de alineamientos de secuencia alrededor del sitio activo de KEX2 con otras proteínas de diversas bases de datos, se encontró una secuencia parcial para un gen llamado *fur* (31); este gen fué clonado de mamíferos y codifica para una proteína de nombre furina. El análisis del cDNA de furina confirmó la homología entre ambos genes. Más adelante se demostró que furina es una enzima que procesa los sitios dibásicos de diversos precursores peptídicos (32).

Posterior al descubrimiento de furina, se caracterizaron los cDNAs de otras enzimas que pertenecen a esta misma familia (33-40). A este grupo de enzimas se les denominó como convertasas; entre ellas se encuentra furina, PC1(o PC3), PC2, PC4, PC5 (también llamada PC6) y PACE4.

La familia de las convertasas posee varias características en común (figura 3):

a) Al igual que los precursores peptídicos, contienen una secuencia señal que les permite internalizarse en el lumen del RER. b) En general se sintetizan a partir de una proteína precursora. c) Presentan un par de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal de un segmento conocido como pro que es procesado para generar a la enzima activa; d) presentan uno o varios pares de aminoácidos básicos a lo largo de su secuencia, así como residuos glicosilados sencillos y complejos. e) Poseen un sitio catalítico constituido por los residuos Asp, His, Ser (característico de las serin proteasas) y un motivo estructural conocido como dominio P que en todas las convertasas conserva la secuencia ArgGlyAsp (RGD) y cuya función se desconoce, sin embargo esta secuencia se encuentra en varias proteínas de la matriz extracelular y es reconocida por las integrinas que están implicadas en la adhesión celular.

Síntesis

A continuación se describen los eventos que se requieren para procesar a las formas precursoras de PC1 y de PC2. Durante el procesamiento de la forma precursora de la enzima, el segmento pro es removido por el corte en el par de aminoácidos básicos que se encuentra al final de este segmento y la enzima adquiere el plegamiento adecuado que le permitirá sufrir modificaciones adicionales en su paso por la vía de

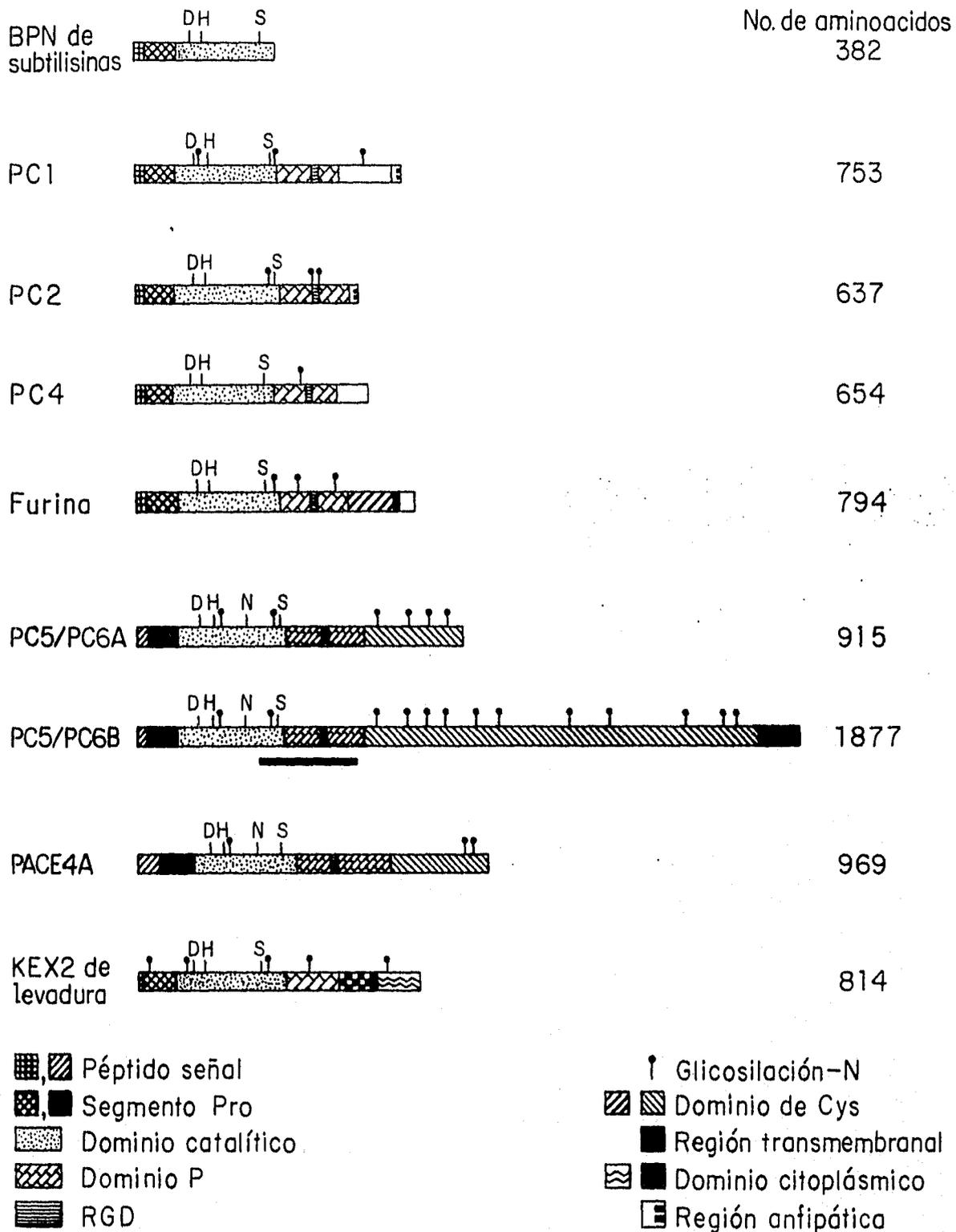


Fig 3 Representación gráfica de la secuencia aminoácida de los precursores de las convertasas. (Tomado de *Journ. Neurosc.*, 1995, 15(3): 1779 y *Biochem. Soc. Trans.*, 1993, 21(3): 686)

secreción. La cinética y el mecanismo de activación para los precursores de PC1 y de PC2, son distintas.

Por ensayos de expresión de los cDNAs de PC1 o PC2 en líneas celulares como AtT20 y GH₄C₁ se ha visto que sus segmentos pro son removidos a diferentes tiempos (41,42). En general, el procesamiento del precursor de PC1(94 KDa) a la forma madura (66 KDa) ocurre mucho más rápido que el de la PC2. El procesamiento inicia a los primeros minutos de la síntesis observándose al poco tiempo un aumento gradual de las formas procesadas (intermediario de 87 KDa y forma activa de 66 KDa) en el RER (42); esto sugiere que la liberación de su segmento pro ocurre de manera cotraduccional o en un tiempo inmediato a la traducción.

La remoción del segmento pro parece ser un evento autocatalítico; para otros precursores, como KEX2 y furina, la remoción de su segmento pro también ocurre por un corte autoproteolítico (43,44). Recientemente se demostró que *in vitro*, PC1 es capaz de procesar a un decapeptido de igual secuencia a los precursores de PC1 de humano y de ratón (45), lo cual requiere de la capacidad de PC1 para autoprocesarse. La conversión de PC1 a la forma madura (87 a 66 KDa), es más lenta que la remoción del segmento pro (entre 1 y 2 hrs); al parecer PC1 se retiene por un tiempo en el RER y después viaja al Golgi, donde es acetilada y sulfatada en los compartimentos cis y medio (41). La forma madura de 66 KDa (la forma glicosilada) se encuentra en el TGN, en donde también se encuentran formas truncadas de la enzima glicosilada.

El procesamiento de la PC2 ocurre lentamente; el precursor (75 KDa) permanece en el RER varias horas después de haber iniciado su síntesis y se requieren por lo menos 6 hrs para que empiece a aparecer la forma procesada de 68 KDa. Esta conversión es lenta porque a las 16 hrs se observa que sólo el 50% del precursor se ha procesado (46). La conversión de PC2 a la forma madura ocurre en el TGN; en este compartimento se encuentran formas sulfatadas (75 y 68 KDa) y no glicosiladas (70 KDa), algunas de las cuales son formas intermediarias de la enzima madura (65 KDa glicosilada).

La liberación del segmento pro de PC2 también parece ser un evento autocatalítico. Por ensayos de mutagénesis dirigida del precursor de PC2 se generaron dos tipos de mutantes: unas que no tienen la secuencia de aminoácidos que se requiere para liberar al segmento pro y otras en donde fué cambiado el aa Asp del sitio activo por Asn. En estos estudios se encontró que a diferencia de la PC2 silvestre, las mutantes no se procesan a las formas maduras. Sin embargo, al incubar a la proteína silvestre con la mutante del sitio activo se encontró que existe procesamiento de las dos; esto sugiere que la conversión es autocatalítica y también que la reacción puede ser intermolecular (46).

Cuando se incuban mutantes en el sitio activo de PC1 o de PC2 con furina no se observa liberación de los segmentos pro. Al parecer furina no interviene en dicho procesamiento. Sin embargo, no se descarta el hecho de que otra convertasa no identificada esté interviniendo en la reacción.

En fechas recientes se demostró que la asociación de la proteína pro7B2 con el precursor de PC2, influye sobre la velocidad de conversión de la enzima a la forma madura. Por ensayos de pulso y caza se determinó que la interacción entre proPC2 y pro7B2 ocurre en los primeros minutos de la síntesis (47).

A concentraciones nanomolares pro7B2 inhibe el corte por PC2 de un péptido de secuencia idéntica a un sitio de corte de PC2; sin embargo, aún a concentraciones

micromolares de pro7B2, la actividad de procesamiento por PC1 hacia un péptido de secuencia idéntica a un sitio de corte de PC1 no se afecta; esto apoya la hipótesis de que pro7B2 inhibe específicamente a PC2. Al parecer esta proteína no actúa como un inhibidor general de la familia de las convertasas.

Estudios *in vivo* también señalan que el precursor de 7B2 se asocia con el precursor de PC2. Al momento de la disociación de ambos precursores, se activa la PC2 e inicia el procesamiento de precursores peptídicos (48). El procesamiento de pro7B2 coincide con la conversión de PC2 a la forma madura. Las evidencias señalan que pro7B2 actúa como una chaperona que guía el transporte y previene la activación prematura del precursor de PC2 dentro de la vía de secreción.

Especificidad para procesar a precursores peptídicos

La detección de los RNAs mensajeros de las convertasas por hibridaciones *in situ* o "Northern blots" ha mostrado un patrón de distribución único para cada convertasa. En general, los RNAs mensajeros de furina y PACE4 se encuentran distribuidos en diferentes tipos de células, lo que sugiere que estas enzimas presentan un rango amplio de acción. El RNAm de PC5 también se localiza en varios tipos de células, pero su distribución no es tan amplia como la de los RNAs mensajeros de furina o de PACE4. Los patrones de distribución de los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 se restringen a células de tipo endócrino y neuroendócrino, mientras que el RNAm de PC4 se detecta únicamente en testículo. Los patrones de distribución de los RNAs mensajeros, tanto de las enzimas de procesamiento, como de los precursores peptídicos, han sugerido que estas enzimas participan en el procesamiento de los precursores peptídicos *in vivo*. El análisis detallado de la distribución de las enzimas en los diferentes tejidos aparece en las refs. 49 y 50.

A través del uso de diversos sistemas de expresión, se ha demostrado la amplia capacidad que tienen estas enzimas para procesar a los diversos precursores peptídicos en los distintos pares de residuos básicos; para algunas de las convertasas, también se ha demostrado su capacidad para procesar a distintos precursores de factores tróficos en estos sitios. Los factores neurotróficos que se sintetizan en el hipocampo, son probables sustratos de furina porque sus formas precursoras requieren del corte en pares de residuos básicos para generar a los factores de crecimiento activos. Utilizando el sistema de expresión del virus vaccinia se señaló que la coexpresión de furina de humano con el precursor de la subunidad β del factor de crecimiento nervioso (NGF), trae como consecuencia la activación específica de este precursor para producir β NGF (51). La coexpresión de furina con el factor de von Willebrand en células COS ha producido la forma madura de esta proteína multimérica del plasma (52); por ensayos de mutagénesis dirigida en el sitio dibásico LysArg del precursor del factor von Willebrand también se encontró que la enzima podía cortar otro sitio de aa básicos (LysLys) aunque con baja eficiencia (53). La participación de las convertasas en el procesamiento de precursores peptídicos como el de la POMC ya ha sido demostrada. Utilizando el sistema de expresión del virus vaccinia para coexpresar a PC1 o a PC2 con POMC en células de secreción constitutiva como BSC-40 o en células de secreción regulada como AtT20 o PC12 se observó que las especificidades de corte de PC1 y de PC2 para este precursor, son diferentes (54); en las líneas celulares analizadas PC1 genera

adrenocorticotropina (ACTH) y β -lipotropina mientras que PC2 genera β -endorfina, ACTH extendida en el N-terminal y α -melanotropina (α -MSH) o desacetil α -MSH. Algunos autores han tratado de determinar si las convertasas procesan también los sitios monobásicos que presentan algunos precursores peptídicos. Un estudio en el que coexpresan a furina con el precursor de la somatostatina (PSS) en células COS7, señala que furina es capaz de procesar el sitio monobásico Arg que genera somatostatina-28, pero no el monobásico Lys que genera somatostatina-14 (55). En estas mismas células, la coexpresión de PC1 o de PC2 con PSS señala que estas enzimas no procesan los sitios monobásicos del precursor (56). En otro sistema de expresión (células AtT20) en donde se coexpresa a PC1 o a PC2 con el precursor de la kalicreína del plasma tampoco se observa procesamiento de su sitio monobásico (57). Queda la posibilidad de que estas enzimas puedan procesar los sitios monobásicos de otros precursores que exhiban la secuencia consenso reportada para estos sitios (58).

Papel de las convertasas en el procesamiento de los precursores peptídicos

En diferentes modelos de regulación, la expresión de las enzimas de procesamiento se ve afectada cuando las condiciones fisiológicas demandan cantidades mayores de péptidos activos que respondan a los estímulos dados. Por ejemplo, la expresión de PC1 y PC2 a menudo es afectada por tratamientos hormonales que alteran la expresión de los precursores peptídicos (59). En los corticotropos de la adenohipófisis, la expresión de PC1 y de la enzima α -amidante, se regula en paralelo con la expresión de POMC en respuesta a glucocorticoides. También en respuesta a tiroidectomía, la expresión de las enzimas PC1, PC2 y α -amidante incrementa dramáticamente y disminuye de nuevo después del tratamiento con un agonista dopaminérgico (60).

Bajo ciertas condiciones experimentales, los niveles de RNAm de algunas de las convertasas también se ven afectados. Después de un aumento crónico en la ingesta de sal por ratas adultas, los niveles de RNAm de vasopresina y de oxitocina de neuronas magnocelulares del NPV del hipotálamo, aumentan considerablemente con el fin de reemplazar las pozas del péptido que está siendo liberado; ambos péptidos están implicados en la osmoregulación. Al mismo tiempo los niveles de RNAm de PC1, se encuentran modificados en las neuronas magnocelulares del NPV y en otra región del cerebro conocida como núcleo supraóptico (NSO); el RNAm de PC2 también se encuentra modificado en el NSO. La expresión aumentada de los RNAs mensajeros de estas enzimas en las neuronas magnocelulares (61) del NPV y del NSO, apoya su posible participación dentro del procesamiento de dichos precursores.

En un modelo de epilepsia se observa que los niveles de expresión de los RNAs mensajeros de PC1 y del factor neurotrófico "brain derived neurotrophic factor" (BDNF) se afectan en paralelo y de manera transitoria en las regiones CA1 a CA3 del hipocampo 2 hrs después de la inducción del daño. Al mismo tiempo, en el giro dentado del hipocampo el RNAm de PC1 aumenta considerablemente junto con un aumento transiente de los RNAs mensajeros de NGF y BDNF; los mensajeros de furina y PC5 también se ven afectados de manera transiente mientras que los RNAs mensajeros de PC2 y PACE4 no se afectan (62). La expresión aumentada de PC1 y en

menor grado de PC5 y de furina, pudiera estar relacionada con la maduración de los factores de crecimiento que se activan durante el estado epiléptico.

Los niveles de expresión de las convertasas PC1 y PC2, se ven afectados después de tratamientos electroconvulsivos (ECT) en las neuronas del hipocampo y al parecer, estos cambios ocurren rápidamente en respuesta a estimulación neuronal. El RNAm de PC1 incrementa rápidamente mientras que el RNAm de PC2 exhibe una respuesta más lenta que sugiere, que bajo estas condiciones ocurren una serie de eventos (síntesis e inducción de factores de transcripción) que son previos a la alteración de los niveles de expresión del RNAm de PC2 (63); la expresión de ambas enzimas se altera de manera diferencial.

2.2 Carboxipeptidasas, amidasas y ciclasas

Posterior al corte endoproteolítico en el carboxilo terminal del par de residuos básicos, el siguiente paso en la maduración del péptido es la remoción de los residuos básicos; este corte es catalizado por la enzima carboxipeptidasa E (CPE, B ó H). Esta enzima, que ha sido purificada de diversas fuentes incluyendo médula adrenal de bovino, es una glicoproteína de alrededor de 50 KDa, tiene un pH óptimo de 5.0 - 6.0 y es estimulada por cobalto, que la distingue de las carboxipeptidasas lisosomales. La actividad de CPE está ampliamente distribuida en el SNC con niveles particularmente altos en el hipotálamo, hipocampo, tálamo y cerebro medio; a niveles más bajos, se localiza también en tallo cerebral, cerebelo, corazón, glándula adrenal, ojo y escasamente se ha detectado en testículos y duodeno (64). La secuencia primaria deducida a partir del cDNA muestra una fuerte homología con la carboxipeptidasa A, con todos los aa catalíticamente importantes alineados en posiciones comparables. Sin embargo, la homología con otras carboxipeptidasas es apenas del 17-20%. La secuencia aa predicha de la enzima también muestra un C-terminal hidrofóbico como forma probable de anclaje a la membrana (65); se encuentran formas solubles y de membrana de la proteína que parecen diferir en peso molecular por 2 KDa.

Para algunos péptidos, es necesaria la ciclización de su N-terminal para que sean activos. La enzima a la que se le ha atribuido esta actividad es la glutaminil ciclasa; esta enzima utiliza como sustrato una glutamina N-terminal para llevar a cabo el proceso de ciclización. Su extracción con buffers de baja fuerza iónica indica que probablemente es una enzima soluble (66); la actividad óptima de la enzima es a pH neutro o alcalino. El pGlu también puede formarse en ausencia de la enzima pero la reacción es más lenta y el proceso es espontáneo sólo bajo ciertas condiciones. La distribución de la enzima es similar a la de la PAM, tanto en hipófisis como en cerebro.

La amidación de los péptidos en el C-terminal es una modificación que a menudo es necesaria para dar actividad biológica a los péptidos. La PAM es una enzima multifuncional, que hidroxila el carbono alfa del residuo de glicina carboxi terminal de los péptidos para posteriormente dejar una amida C-terminal en el aminoácido que precede a la glicina. La PAM utiliza como cofactor al cobre y requiere la presencia de O₂ molecular para catalizar el consumo de ácido ascórbico; es inhibida por quelantes iónicos divalentes. La enzima activa está conformada por dos dominios. Igual que para la CPE, al ser removido un pequeño propéptido del N-terminal se genera la forma madura de la enzima que esta anclada a la membrana.

Las 2 formas solubles purificadas de PAM se generan por el corte proteolítico en los residuos básicos que dan como resultado una proteína de 54 y otra de 39 KDa. PAM es una enzima que esta ampliamente distribuída (68) ya que se encuentra en hipófisis, cerebro, glándulas salivales, corazón y riñón entre otros.

3. Hormona liberadora de la tirotrópina (TRH)

3.1 Características generales

En el genoma de la rata, el gen que codifica para el TRH se presenta en una copia. La unidad transcripcional contiene tres secuencias exónicas intercaladas con dos secuencias intrónicas. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida del RNAm; el exón 2 codifica para el N-terminal y el péptido señal del precursor y el exón 3 codifica para 5 copias de TRH, péptidos crípticos y región 3' no traducida del RNAm (69).

El TRH ($p\text{GluHisProNH}_2$) se sintetiza a partir de una proteína precursora de alto peso molecular. La secuencia de aminoácidos deducida señala que el precursor tiene un peso molecular de 26 KDa, que contiene 5 veces repetida la secuencia Gln-His-Pro-Gly que dará origen al TRH. Estas secuencias se encuentran flanqueadas en el extremo N-terminal por pares de aa básicos LysArg y en el extremo C-terminal por pares de aa básicos Lys-Arg o Arg-Arg. La hidrólisis del precursor a nivel de los pares de aa básicos dará inicio a una cascada de eventos enzimáticos que traerá como consecuencia la modificación de las secuencias Gln-His-Pro-Gly en los extremos amino y carboxilo terminal para generar al TRH (figura 4).

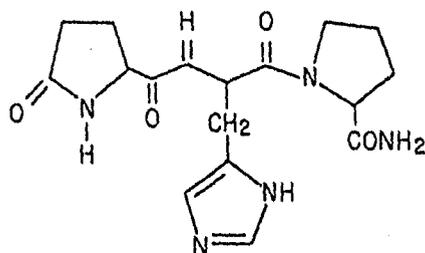


Fig 4 Esquemización del TRH ($p\text{glu-his-proNH}_2$)

El precursor de TRH se encuentra distribuido en el SNC en areas como bulbo olfatorio, hipocampo, núcleos hipotalámicos y algunos núcleos del tallo cerebral y es procesado diferencialmente dependiendo del tejido, para generar al TRH y a los péptidos crípticos.

Aunque inicialmente el TRH se clasificó como una hormona cuyo efecto directo se ejercía sobre la hipófisis, actualmente es bien conocido su efecto como neuromodulador (70,71). Su distribución extrahipotalámica en el cerebro, su localización a nivel de las sinapsis, su liberación en terminales sinápticas, la unión a receptores de alta afinidad en diferentes zonas, los efectos específicos sobre la actividad neuronal y la presencia de peptidasas membranales capaces de inactivarlo, proporcionan una serie de hechos que lo señalan como un neuromodulador.

En algunas condiciones patológicas también se han identificado cambios

relacionados con el TRH, por ejemplo en la enfermedad de Huntington, esquizofrenia, epilepsia, Alzheimer, depresión, enfermedades primarias de la tiroides, adenomas hipofisarios, anorexia nerviosa y otros desórdenes metabólicos endócrinos (72,76).

Se sabe también, que el TRH mejora la sobrevivencia neuronal en diferentes modelos de trauma en el SNC (77) y también se han visto efectos positivos del TRH en casos de daño a médula espinal y de atrofia muscular (78).

Uno de los sistemas mejor conocidos en los que actúa el TRH es el del eje hipotálamo hipofisario. En el NPV del hipotálamo, la mayor parte de las neuronas TRHérgicas, proyectan sus terminales nerviosas a la eminencia media del hipotálamo. En esta región se localiza un sistema capilar que se comunica directamente con el lóbulo anterior de la glándula hipofisaria (sistema portal hipotalámico). El TRH que se libera en esta zona, se transporta por los vasos capilares hasta la adenohipófisis en donde estimula la síntesis y liberación de la hormona estimulante de la tirotropina (79) y de prolactina (80,81).

3. 2 Procesamiento del precursor

La presencia de múltiples copias de TRH dentro de un mismo precursor, pudiera asegurar la presencia del péptido en diferentes partes del sistema neuroendócrino a través del corte de los pares de residuos básicos que flanquean a las secuencias que codifican para el TRH.

En el hipotálamo, la relación molar entre el TRH procesado y los péptidos crípticos corresponde a la relación esperada para el procesamiento completo del precursor. En este tejido apenas se detectan trazas de moléculas de TRH extendidas en su terminal carboxilo -GlnHisProGlyLysArg ó ArgArg - (82,83); sin embargo, en otros tejidos como bulbo olfatorio, el patrón observado para los péptidos extendidos de TRH (GlnHisProGlyArgArg) es mayor que el de TRH; la proporción de los péptidos crípticos en este tejido también es baja (83). Posiblemente las enzimas que regulan el procesamiento del precursor difieren en los distintos tejidos.

En el bulbo olfatorio, los pares de residuos básicos del N-terminal (Lys-Arg) son procesados con más eficiencia que los del C-terminal (Arg-Arg). Las enzimas involucradas en el corte de los residuos básicos del C-terminal pudieran ser diferentes de las que se requieren para procesar el N-terminal y posiblemente están ausentes en este tejido; sin embargo, también es posible que las enzimas que procesan al precursor de TRH en este tejido no sean las mismas que las que se requieren para procesarlo en el hipotálamo. El procesamiento diferencial del proTRH pudiera ser un reflejo del nivel celular de expresión de las enzimas de procesamiento y/o de su actividad en un tejido dado.

El significado biológico para la mayoría de los péptidos crípticos y las secuencias extendidas no se conoce; sin embargo, recientemente se demostró que el péptido críptico Ps4 (proTRH₁₆₀₋₁₆₉) potencia el efecto del TRH sobre la liberación de TSH en células adenohipofisarias (83). Esto demuestra, que dos péptidos distintos derivados de un mismo precursor pueden actuar al mismo tiempo sobre la célula blanco para modular los niveles de la hormona que se está liberando. También se demostró recientemente que otro de los péptidos crípticos que conforman al precursor de TRH (proTRH₁₇₈₋₁₉₉) actúa como un factor hipotalámico que inhibe la síntesis y liberación tanto basal como estimulada por el factor liberador de la corticotropina

(CRF) de la ACTH de células adenohipofisarias (84).

3. 3 Cambios relacionados con la síntesis y el procesamiento del precursor

Dentro de la biosíntesis del TRH existen varias etapas que son susceptibles de regulación; con el fin de definir cuáles eventos se están regulando durante la síntesis, se han estudiado diversas condiciones fisiológicas que involucran la presencia del péptido.

En la ontogenia se observa que un aumento en el nivel del RNAm de TRH, correlaciona directamente con cambios en los niveles del TRH (85); al parecer el RNAm establece los niveles de péptido activo.

En condiciones experimentales como el estrés por frío se han observado cambios en los niveles del RNAm de TRH (86) en el NPV, que correlacionan con cambios en la liberación del péptido. Bajo esta condición, el RNAm de TRH aumenta de manera transitoria y no se observan cambios en el contenido de TRH de la eminencia media, lo que sugiere que el procesamiento del precursor está aumentado para mantener abastecidos los compartimentos celulares que contienen al TRH que se está liberando.

En una condición fisiológica como la lactancia continua, los niveles de RNAm en el NPV no cambian pero el contenido de TRH en la eminencia media aumenta y el nivel de PRL también aumenta, lo cual indica que la traducción ó los eventos postraduccionales deben estar incrementados (87). Para responder con certeza a estas hipótesis, es necesario conocer si las enzimas involucradas en el procesamiento del precursor (convertasas ó PAM) se regulan en forma paralela a la regulación de la expresión del proTRH.

JUSTIFICACION

Dentro de la biosíntesis de los precursores peptídicos, existen varias etapas que son susceptibles de regulación. Para el TRH que se libera del NPV a la eminencia media, se observa que bajo algunas condiciones experimentales, en las que ocurre un aumento en la liberación del péptido, también aumentan en los niveles de su RNAm, mientras que en otros casos, el aumento en la liberación del péptido sólo puede explicarse por un aumento en la traducción ó el procesamiento del precursor (85-87).

El procesamiento del precursor a nivel de los aminoácidos básicos es un paso limitante para la maduración de los péptidos activos. En la actualidad se han identificado ya algunas de las enzimas involucradas en dicho proceso y al parecer estas enzimas no son péptido-específicas, lo que significa que tienen un amplio repertorio de precursores sobre los que actúan. Por otra parte, el procesamiento de los precursores es tejido-específico al igual que la síntesis de las enzimas. En este contexto, una de las interrogantes consiste en conocer que convertasas están involucradas en el procesamiento del precursor del TRH que se localiza en el NPV del hipotálamo. Como un primer enfoque se decidió investigar a los RNAs mensajeros de 2 de las convertasas (PC1 y PC2) porque su expresión se limita a tejidos endócrinos y al sistema nervioso central y además porque existen evidencias experimentales *in vitro* que apoyan la hipótesis de que *in vivo* estas enzimas pudieran ser las responsables de procesar al precursor de TRH.

OBJETIVOS

GENERAL

El objetivo general de nuestro grupo de trabajo consiste en estudiar la regulación del metabolismo del TRH dentro del eje hipotálamo hipofisiario.

PARTICULAR

El objetivo particular consistió en determinar si los RNAs mensajeros de PC1 y/o de PC2 se localizan en las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo de la rata.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para determinar si los RNAs mensajeros de PC1 y/o de PC2 se localizan en las neuronas TRHérgicas del NPV, se realizaron ensayos de hibridación *in situ* en los que se detectaron los RNAs mensajeros de interés en cortes coronales del NPV de cerebro de rata.

Para ello se llevaron a cabo dos estrategias, una de ellas consistió en determinar la presencia de los RNAs mensajeros de TRH y de PC1 ó de TRH y de PC2 en rebanadas contiguas de cerebro de rata de 10 micras de grosor. Los cortes fueron analizados con un sistema analizador de imágenes que se encuentra adaptado al microscopio óptico y posteriormente se realizaron los empalmes de las maquetas de las células distribuídas en el NPV que fueron positivas al RNAm de interés (tanto en forma manual como automática). Se realizó un ensayo en el que se hibridó toda la zona del NPV de un cerebro contra el RNAm de TRH, con el fin de determinar si el grosor del corte elegido era el adecuado para encontrar eventos de localización de una misma célula en dos cortes adyacentes y también para determinar el número máximo de eventos en dos cortes adyacentes. Para determinar si existían o nó eventos fortuitos en los empalmes, se realizó un control en el que se hibridó al RNAm de TRH de forma contigua con el RNAm del CRF, que al igual que el TRH, se encuentra presente en la zona parvocelular del NPV; se esperaba que no hubiera colocalización porque no se ha reportado que ambos mensajeros coexistan en la misma neurona (89). Posterior a los experimentos control se realizaron los ensayos de hibridación para determinar la existencia de los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en neuronas TRHérgicas del NPV en cortes contiguos.

Para corroborar los resultados obtenidos de las rebanadas contiguas, la estrategia alternativa consistió en implementar en una misma rebanada un ensayo de doble marcaje por hibridación *in situ*, empleando sondas acopladas a digoxigenina y sondas radiactivas. El análisis de los resultados también se llevo a cabo mediante el uso del sistema analizador de imágenes y las señales obtenidas por este medio se compararon con los resultados anteriores.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Se emplearon ratas macho Wistar adultas de 300 gr de peso promedio. Las ratas se sacrificaron por decapitación y los cerebros se extrajeron y congelaron rápidamente en hielo seco; posteriormente se guardaron a -70°C cubiertos con parafilm y papel aluminio hasta su uso.

Los cortes de tejido se hicieron con un criostato a 10 o 12 micras de grosor, se montaron en portaobjetos (cat. No.12-550-15 de Fisher Scientific) y se almacenaron a -70°C .

2. Material y H_2O

Todo el material de vidrio que se empleó para la preparación y almacenamiento de las soluciones se horneó a 200°C durante toda la noche. El material de vidrio sensible a las altas temperaturas y el de plástico, fué esterilizado en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 min.

Para preparar todas las soluciones ó para resuspender las sondas de DNA, se utilizó H_2O desionizada milliQ (calidad: $18\text{M}\Omega/\text{cm}$) colectada en frascos horneados y filtrada y esterilizada en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 min.

3. Marcado de sondas

3. 1 Oligonucleótidos marcados con γ -ATP[^{32}P] ó α -dATP [^{35}S]

Se emplearon dos oligos para PC1, dos oligos para PC2 (48ameros), un oligo para TRH (50amero) y un oligo para CRF (48amero). Todos ellos sintetizados en la Unidad de síntesis del IBT. Los oligos A y B de PC1 están dirigidos a las bases 1234 - 1281 y 1744 - 1791 de la secuencia de su cDNA respectivamente, los oligos A y B de PC2 están dirigidos a las bases 1366 - 1413 y 1998 - 2045 de la secuencia de su cDNA respectivamente (90), el oligo de TRH está dirigido a las bases 317 - 367 de su cDNA (oligo no publicado) y el oligo de CRF está dirigido a las bases 496 - 543 de su cDNA (91); todas las secuencias provienen de los cDNAs de la rata.

Se realizaron reacciones de fosforilación para cada uno de los oligos recién sintetizados (PC1A y B, PC2A y B y CRF) con el fin de comparar la eficiencia de incorporación de γ -ATP[^{32}P] con los valores que se obtienen para el oligo de TRH dado que este último se utiliza rutinariamente en el laboratorio. Para cada reacción de fosforilación se emplearon 2 pmolas del oligo, buffer para la cinasa 1x (buffer 10x= 500 mM de Tris HCl pH 8.2, 100 mM de MgCl_2 , 1 mM de EDTA, 50 mM de ditioneitol -DTT-, 1 mM de espermidina), 20 μCi de γ -ATP[^{32}P], espermidina 0.1 M, 1.5 μl de T_4 polinucleótido cinasa 10 U/ μl (Promega) y H_2O para un volumen final de 20 μl . La mezcla de reacción se incubó durante 1hr a 37°C y posteriormente se tomaron 0.5 μl para medir el porcentaje de incorporación del γ -ATP[^{32}P] en el oligo (ver anexo 1). También se realizó una electroforésis (con una alícuota de cada reacción) en gel de acrilamida al 20%- 8M urea, TBE 1x (89 mM tris borato, 2mM EDTA pH 8.0) con la finalidad de verificar que los tamaños de los oligos fueran los indicados. La electroforésis se corrió a 350 voltios durante 45 min en buffer TBE 1x y posteriormente se envolvió el gel en papel adherente, se colocó en un caset de exposición con un film (kodak T-Mat, G/RA, Cat. 601-8337) y se expuso durante toda la noche a temperatura ambiente (T.A).

Para las hibridaciones *in situ*, se emplearon oligonucleótidos α - dATP [^{35}S]. Los oligos se marcaron en su terminal 3' (con un kit de Boehringer) utilizando 1.5 μl de deoxiribonucleotidil transferasa terminal (25 U/ μl), buffer para la enzima a una concentración final de 1x (Buffer 5x = cacodilato de potasio 1M, Tris HCl 125mM pH 6.6, albúmina de bovino 1.25 mg/ml), CoCl_2 5mM, 30 μCi de α - dATP [^{35}S], 2 picomolas de DNA y agua bidestilada y esterilizada para un volumen final de 15 μl . La mezcla de reacción se incubó durante 30' a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron 0.5 μl de la mezcla de reacción para medir el porcentaje de incorporación del α - dATP [^{35}S] en el oligonucleótido (ver anexo 1).

El resto de la reacción se precipitó a -20°C con 1 μl de tRNA 10 mg/ml como coprecipitante, 1 μl de EDTA 0.5M, 1.5 μl de NaOAc 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hora. Los tubos se centrifugaron a 40°C y 15000 rpm durante 30 min (Centrifuga refrigerada de mesa MR18-22 marca Jouan, rotor de ángulo abierto de 60 mm) y posteriormente se decantaron con cuidado (se aspiró el sobrenadante poniendo la punta de la pipeta por una de las paredes del tubo); el pellet se secó a temperatura ambiente y después se resuspendió en 22.5 μl de agua y 2.5 μl de ditioneitol (DTT) 10 mM. Se resuspendió por vortex y se tomó 1 μl por duplicado para determinar las cpm's totales y la actividad específica (ver anexo 1).

Una muestra de cada uno de los oligos marcados se analizó por electroforesis en un gel de acrilamida al 20%- 8M urea, TBE 1x con la finalidad de verificar que no estuvieran degradados o contaminados con marca no incorporada. La electroforesis se corrió a 350 voltios durante 45 min en buffer TBE 1x y posteriormente el gel se envolvió en papel adherente, se colocó en un caset de exposición con un film kodak T-Mat y se expuso durante toda la noche a temperatura ambiente (T.A).

3. 2 Transcripción *in vitro* utilizando isótopos radiactivos

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* de los cRNAs de PC1 y de PC2, se utilizaron fragmentos de sus cDNAs. El fragmento del cDNA de PC1 está clonado en bluescript+ de las bases 715 - 1206; el fragmento del cDNA de PC2 también está clonado en bluescript+ y va de las bases 878 - 1326. El cDNA completo de TRH consta de 1200 pb y está clonado en pGEM2. Previamente se realizó la amplificación, purificación y linearización de los plásmidos así como la purificación de los fragmentos para las PC's y del cDNA de TRH.

Para preparar sondas de cRNA radiactivas con alta actividad específica, se emplearon 125 pmolas de α -UTP [^{33}P] o α -UTP [^{35}S] (actividad específica 1000 Ci/mmol) ó una mezcla equivalente a 120 pmolas de UTP frío con UTP radiactivo para llevar a cabo la reacción; el nucleótido marcado se colocó en un tubo eppendorf siliconizado y se secó durante 15 minutos en un liofilizador (Savant); posteriormente se adicionaron los reactivos en el orden siguiente (Kit de Boehringer):

1 μl de buffer de transcripción 10x (THCl 0.4M pH 8.0, MgCl_2 60mM, DTT 100mM, espermidina 20mM), 1 μl de DTT 100mM disuelto en agua (recién preparado)

1.5 μl de la mezcla de NTP's (A,G y C 10 mM)

1 μg de DNA del plásmido linearizado que contiene el cDNA de PC1, PC2 o TRH previamente desnaturalizado a 65°C durante 5'

0.5 μl de RNAsin 40 U/ μl

1 μ l de RNA polimerasa T7 20 U/ μ l
H₂O para un volumen final de 10 μ l

La mezcla de reacción se incubó durante 1hr a 37°C. Transcurrido este tiempo se adicionó 1 μ l más de RNA polimerasa T7 y se incubó nuevamente por 1 hora. Posteriormente se adicionaron:

0.5 μ l de tRNA 10 mg/ml
0.5 μ l de RNAsin 40 U/ μ l
0.5 μ l de DNAsa Q 10 U/ μ l

Se mezcló suavemente y se incubó nuevamente a 37°C durante 45 min.

Para precipitar el transcrito se adicionaron 40 μ l de la solución para parar la reacción (NaOAc 0.6M, EDTA 10 mM y SDS al 1%). En este momento se tomó una alícuota de 1 μ l para determinar la eficiencia de incorporación de acuerdo al método descrito en el anexo 1.

Posteriormente se hizo una extracción con 50 μ l de fenol- cloroformo (1:1) y se centrifugó por 5 minutos a 7000 rpm a T.A; se colectó el sobrenadante y se hizo una extracción más con 50 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se agitó suavemente invirtiendo el tubo y se centrifugó por 5 min a 7000 rpm a T.A. Se colectó el sobrenadante y se hizo una primera precipitación con NaCl 4M (1/10 de volumen) y 3 volúmenes de etanol absoluto durante una hora a -70°C. Posteriormente se centrifugó durante 30 min a 15000 rpm a 4°C, se decantó con cuidado (de preferencia quitando el sobrenadante con una micropipeta por una de las paredes del tubo) y se dejó secando a T.A por un tiempo aproximado de 20 minutos. El pellet se resuspendió en 25 μ l de H₂O tratada con dietil pirocarbonato (H₂O-DPC) al 0.1 % y se precipitó nuevamente con NaCl 4M (1/10 del volumen) y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1hr a -70°C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 15000 rpm por 30 min a 4°C, se decantó el sobrenadante con cuidado y se secó el pellet durante un tiempo aproximado de 20 minutos. Finalmente se resuspendió el pellet en H₂O-DPC, 0.02% SDS y se vortexeó muy bien; se tomó una alícuota de 1 μ l por duplicado para determinar la actividad específica y otro μ l para determinar la longitud del transcrito por electroforesis en gel, el resto se congeló a -70°C hasta su uso.

Para la electroforesis, se tomó 1 μ l de la reacción previa y se diluyó en H₂O-DPC para tener medio millón de cuentas totales; la alícuota resultante se mezcló con 5 μ l de "stop mix" de secuencia (100% formamida, 0.25% xilen cianol, 0.25% azul de bromofenol) y se corrió en un gel en condiciones desnaturalizantes (acrilamida al 7%-8M urea, TBE 1x) junto con un marcador de peso molecular (RNA ladder 0.155-1.77 kb) durante 45 min a 350 volts. Al término de la electroforesis, se separó el carril del marcador y se tñió 1 min con bromuro de etidio; el resto del gel se envolvió en papel adherente y se expuso a un film de kodak T-Mat durante 1 hr a T.A. El tamaño del transcrito se verificó al comparar la señal en el film con el marcador de peso mol.

3.3 Transcripción *in vitro* empleando UTP- Digoxigenina (UTP-Dig)

El procedimiento a seguir para transcribir cRNAs con digoxigenina fué similar al anteriormente descrito con radiactividad a excepción del paso de extracción con fenol-cloroformo que para este caso se omite.

En un tubo de microcentrífuga siliconizado se adicionó lo siguiente:

1 µg de DNA linealizado y desnaturalizado a 650C por 5 minutos

2 µl de buffer de transcripción 10x

1 µl de DTT 100mM recién preparado

3 µl de la mezcla de NTP's (A, G y C 10mM)

1 µl de UTP 1.8 mM

2 µl de UTP-Dig 10mM

0.5 µl de RNAsin 20 U/µl

1.5 µl de RNA polimerasa T7 20 U/µl

H₂O para un volúmen final de 20 µl

La mezcla de reacción se incubó por 1 hr a 370C y transcurrido este tiempo, se adicionó 1.5 µl más de polimerasa T7 y se incubó nuevamente a 370C por 1 hr. Para degradar al DNA templado, se adicionó lo siguiente:

1 µl de DNAsa Q 10 U/µl

0.5 µl de RNAsin 20 U/µl

0.5 µl de tRNA 10 mg/ml

Se mezcló suavemente y se incubó durante 45 minutos a 370C.

Posteriormente, el volúmen se ajustó a 100 µl adicionando DTT 20mM (concentración final 5 mM). El cRNA se precipitó adicionando NaCl 4M (1/10 del volúmen total) y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1hr a -700C. Al término de la precipitación, se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 40C. Se decantó el sobrenadante (con una micropipeta, por una de las paredes del tubo), se secó a T.A por 20 min y se resuspendió en 25 µl de H₂O-DPC con 0.02% de SDS. Dado que los transcritos con Dig son muy estables cuando se almacenan a bajas temperaturas (-700C), se hicieron varias reacciones a la vez y se almacenaron a -700C hasta su uso. La incorporación del UTP-Dig al transcrito se verificó por transferencia del RNA a una membrana y posterior detección del color como se describe en el anexo 2.

4. Hibridaciones *in situ*

4.1 Preparación de los tejidos

Los cortes de cerebro de 10 o 12 micras de grosor, almacenados a -700C, se descongelaron con una secadora de mano con calor suave a una distancia aproximada de 1 metro y se trataron de la manera siguiente:

Fijación de los tejidos en paraformaldehído al 4%- PBS 1x (PBS 10x = NaCl 1.36 M, KH₂PO₄ 14.7 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KCl 26.8 mM) por 15 min

2 lavados en PBS 1x de 5 min c/u

1 paso de acetilación en SSC 4x (NaCl 0.6 M, NaCl 0.06 M, pH 7.0), anhídrido acético 0.25% y trietanolamina 0.1M por 10 min

Deshidratación de los tejidos en etanol al 75, 80 y 95 % por 2 min cada vez

Deslipidación en cloroformo por 10 min

1 lavado en etanol absoluto por 2 min

Hidratación en etanol al 95% por 2 min y secado de los tejidos a T.A.

4. 2 Hibridación *in situ* empleando oligonucleótidos α - dATP [^{35}S]

Posterior al tratamiento de los tejidos, los cortes de tejido se cubrieron con 30 μl de mezcla de hibridación que en 1 ml contiene:

1 picomola del oligo dATP [^{35}S] (actividad específica $4.8-9.5 \times 10^8 \text{ cpm}/\mu\text{g}$), SSC 4x, 50% formamida, 10% dextrán sulfato, 100mM de fosfato de sodio pH 7.4-1% sarcosil, Denhardt's 1x (Denhardt's 100 x = 1 gr de ficoll, 1 gr de polivinil pirrolidona, 1 gr de albúmina de bovino grado 5, H₂O para 50 ml), 250 μg de DNA de esperma de salmón (DNAss) desnaturalizado durante 15 min a 65°C, 250 μg de tRNA de levadura, 50mM de DTT, 250 μg de polyA y agua. Sobre la mezcla de hibridación se colocó una cubierta de Parafilm y todas las laminillas se colocaron en una cámara húmeda (con agua estéril) y se incubaron a 42°C durante 15 a 18 hrs.

Lavados posteriores a la hibridación

Al término de la hibridación, se retiraron las cubiertas de parafilm con SSC 1x y se hicieron los siguientes lavados con agitación, en función de la T_m de los oligos, para retirar el oligo α - dATP [^{35}S] no hibridado:

Oligo de TRH:

2 lavados de 30 min c/u en 1xSSC, 50% formamida a 45°C

4 lavados de 30 min c/u en 0.1xSSC, 0.02% SDS a 45°C

Oligo de CRF:

2 lavados de 10 min c/u en 1xSSC a T.A

4 lavados de 15 min c/u en 2xSSC, 50% formamida a 40°C

2 lavados de 30 min c/u en 1xSSC a T.A

Oligos A y/o B de PC1:

2 lavados de 30 min c/u en 2xSSC, 50% formamida a 42°C

2 lavados de 30 min c/u en 0.1xSSC, 0.02% SDS a 42°C

2 lavados de 30 min c/u en " " a 50°C

Oligos A y/o B de PC2:

2 lavados de 30 min c/u en 1xSSC, 50% formamida a 45°C

2 lavados de 30 min c/u en 0.1xSSC, 0.02% SDS a 45°C

2 lavados de 30 min c/u en " " a 50°C

Al término de los lavados, los tejidos se deshidrataron en:

etanol 75% por 2 min

etanol 80% por 2 min

etanol 95% por 2 min

Posteriormente se realizó el secado de las laminillas en forma vertical y la exposición de los tejidos a una película autoradiográfica (hiperfilm βmax de Amersham) ó a una emulsión fotográfica (ver anexo 3).

4.3 Hibridación *in situ* empleando transcritos α -UTP [^{33}P] ó [^{35}S]

Para cualquier ensayo de hibridación, se puede preparar la mezcla de hibridación con anterioridad, ya que es estable a -20°C entre 2 y 4 meses. Para preparar 10 ml del stock se utiliza 1 gr de dextrán sulfato en 3.2 ml de H_2O que se mezcla por inversión constante durante 3 hrs a T.A; posteriormente se le adiciona 1 ml de SSC 20x, 100 μl de tRNA de levadura (10mg/ml), 200 μl de Denhardt's 50x y 500 μl de DNAs (10mg/ml) previamente desnaturizado por 15 min a 65°C . Cuando todo esta mezclado se adicionan 5 ml de formamida desionizada, se mezcla y se guarda a -20°C .

Los ensayos de hibridación con los transcritos, se realizaron adicionando 30 μl de la mezcla de hibridación con 5 a 8ng del transcrito/ laminilla (actividad específica $1.2 - 3 \times 10^9$ cpm/ μg), previamente desnaturizado durante 5 min a 65°C y 100 mM de DTT disuelto en NaOAc 0.01 M; los tejidos se cubrieron con Parafilm y la hibridación se realizó a 52°C entre 6 y 12 hrs en una cámara húmeda (saturada con 50% de formamida en H_2O). Posteriormente se retiraron las cubiertas de Parafilm con SSC 1x a T.A y se realizaron los siguientes lavados con agitación:

- 2 lavados de 15 min c/u en SSC 1x a T.A
- 1 lavado de 5 min en 2xSSC, 50% formamida a 52°C
- 1 lavado de 20 min en 20xSSC, 50% formamida a 52°C
- 2 lavados de 5 min c/u en 2xSSC a T.A
- 1 incubación de 30 min en 2xSSC, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAsa A, 1mM EDTA a 37°C
- 2 lavados de 3 min c/u en 2xSSC a T.A
- 1 lavado de 15 min en 2xSSC, 50% formamida a 52°C
- 1 paso en etanol 70% de 3 min
- 1 paso en etanol 80% de 3 min
- 1 paso en etanol 95% de 3 min
- 3 pasos rápidos en agua
- 2 pasos rápidos en etanol 75%

Los tejidos se secaron en forma vertical y posteriormente se expusieron a una película (hiperfilm β max) entre 36 y 78 hrs para detectar la señal a nivel macroscópico. Para detectar la señal a nivel celular, las laminillas se expusieron a una emulsión fotográfica (anexo 3) el doble del tiempo que se expuso para revelar el film. Para una mejor detección de la señal de hibridación, las células se contrastaron con las diferentes técnicas que se describen en el anexo 4.

4.4 Hibridación *in situ* empleando doble marcaje

A cada laminilla se le adicionaron 30 μl de la mezcla de hibridación descrita en el párrafo anterior más lo siguiente: 100 mM de DTT recién preparado (disuelto en NaAc 0.01M), 5- 8ng del transcrito radiactivo previamente desnaturizado durante 5 min a 65°C y 1.5 μl del transcrito de dig (100ng) también desnaturizado. El ensayo de hibridación se llevó a cabo a 52°C durante 12 hrs.

Los lavados para quitar el exceso de la sonda, se realizaron igual a los descritos en la sección anterior, sin llegar a la deshidratación con etanol. Enseguida se prepararon los tejidos para la detección inmunocitoquímica de la sonda acoplada a digoxigenina; en un recipiente, se colocaron las laminillas de manera vertical y se incubaron como sigue:

Reactivo para bloquear durante 1 hr a T.A con agitación.

Buffer A-I (100 mM Tris HCl pH 7.6, 100 mM de NaCl, 0.3 % de Tritón X-100 y 2 % de albúmina de bovino grado radioinmunoensayo) por 30 min a T.A con agitación.

2 lavados de 10 min c/u con buffer A-II (100 mM Tris HCl pH 7.6, 100 mM de NaCl) Enseguida se separaron las laminillas para incubarlas con anticuerpo antidigoxigenina acoplado a peroxidasa (1:100) ó con anticuerpo antidig acoplado a fosfatasa alcalina (1:1000) durante 24 o 48 hrs a 40°C.

Posteriormente se desarrolló la reacción colorida de la manera siguiente:

a) Revelado de la reacción con la peroxidasa

Se retiró el anticuerpo y las laminillas se lavaron 2 veces en bufer A-II por 10 min cada vez.

Se preparó una solución que en 50 ml contuvo: 0.1M de Tris HCl pH 7.6 y 10 mg de diaminobenzidina (DAB) filtrados al momento de mezclar y posterior adición de 10 µl de peróxido de hidrógeno. Esta solución se utilizó para incubar las laminillas del paso anterior.

La aparición del color se monitoreó a los 20, 30 y 40 min al microscopio.

La reacción se detuvo incubando las laminillas con Tris HCl 0.1M pH 7.6, 300 mM de NaOAc durante 3 min. Se dieron 2 pasos rápidos de agua y se secaron a T.A.

b) Revelado de la reacción con la fosfatasa alcalina

Se retiró el anticuerpo y las laminillas se trataron de la manera siguiente:

Se lavaron 1 vez por 10 min en bufer A-II y 2 veces por 10 min en bufer B (checando que el pH fuera de 9.5)

Se incubaron en 10 ml de bufer B (100 mM de Tris HCl pH 9.5, 100 mM de NaCl, 50 mM de MgCl₂) que contenía 2.4 mg de levamisol, 45 µl de cloruro de nitroazul de tatrafolio (NBT) 100 mg/ml y 35 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato, 4-toluidina (X-fosfato) 50 mg/ml, para revelar el color. *dado que ambos reactivos son sensibles a la luz, el tubo con la solución se protegió con papel aluminio.

La reacción se monitoreó a los 15, 30 y 45 min y una vez detectado el color se paró la reacción dejando las laminillas 3 min en bufer B.

Se hicieron 2 pasos rápidos en agua y se secaron a T.A

Para detectar la señal radiactiva en los experimentos de doble marcaje, se colocó un film sobre las laminillas inmediatamente después de que se secaron ó se procedió a la detección celular del transcrito radiactivo por exposición a la emulsión fotográfica. Para estandarizar los tiempos de exposición a la emulsión, se colocó el film en varios ensayos con el fin de determinar el tiempo de exposición adecuado a la emulsión.

5. Cuantificación celular mediante el uso de un sistema analizador de imágenes

Una vez realizados los ensayos de hibridación *in situ*, se procedió a la identificación de las células que fueron positivas al RNAm de interés, mediante el uso de un sistema analizador de imágenes.

El software (Histoscan.s de Biocom), permitió el análisis cuantitativo de las células con señal radiactiva, que se obtuvieron al exponer los tejidos hibridados a la emulsión fotográfica (deposición de granos de plata sobre el tejido). El sistema consta de un sensor de coordenadas que se adapta a la platina del microscopio, una cámara de video montada sobre el microscopio y una pantalla de TV que permite observar la imagen amplificada de la señal vista con el microscopio.

Para llevar a cabo la cuantificación celular, se colocaron las laminillas de los cortes seleccionados en el microscopio (una a una) y se trazó con el "mouse" el NPV y el tercer ventrículo, a un aumento de 10x. Con el objetivo de mayor resolución (100X) se situó a la preparación dentro de los contornos trazados, se fijó la imagen y se marcaron las células positivas dentro de las regiones de interés. De esta manera se obtuvieron todos los mapas de las células positivas al RNAm de interés dentro del NPV. El análisis de los resultados para las hibridaciones en cortes contiguos se realizó de dos formas: manual y automático.

Para la cuantificación manual, se imprimieron todos los mapas de un experimento, tomando en cuenta que las escalas de impresión para los cortes contiguos fueran las mismas. El empalme entre dos mapas se realizó sobrelapando el tercer ventrículo de cada uno de los mapas. Para este trabajo, los empalmes se refirieron siempre al tercer ventrículo porque esta estructura se encuentra en medio del NPV y su forma y tamaño se conserva a lo largo de esta región. La cuantificación de las células que se encontraron en dos cortes contiguos se hizo sobrelapando las maquetas de los dos cortes. Los objetos que se sobrelaparon correspondieron a las células que contuvieron a los 2 RNAs mensajeros de interés. El porcentaje de localización se midió con respecto al número total de células TRHérgicas que se marcan en uno de los mapas.

Para el análisis automático se seleccionaron 2 mapas de cortes contiguos y uno de ellos se refirió como mapa patrón (sobre el cual rota el otro); siempre se tomaron como patrón los mapas de TRH; el mapa contiguo se designó como el mapa a rotar. Se utilizó un programa diseñado por el Dr. Gabriel Corkidi Blanco para que las maquetas se alinearan (por su centro de gravedad) en torno al tercer ventrículo. Al alinear las maquetas, se realizaron desplegados de las imágenes para verificar que estuvieran empalmadas de la mejor manera; cuando los mapas no se sobrelaparon bien, se emplearon comandos adicionales que permitieron cambiar el ángulo o la posición del mapa a rotar.

El resultado de los empalmes se obtuvo en base al diámetro del objeto que se marca sobre las células. El radio de búsqueda que se le dió al programa para localizar todos los puntos sobrelapados entre las 2 maquetas fué de 7; el resultado de los objetos sobrelapados se guardó como un mapa nuevo.

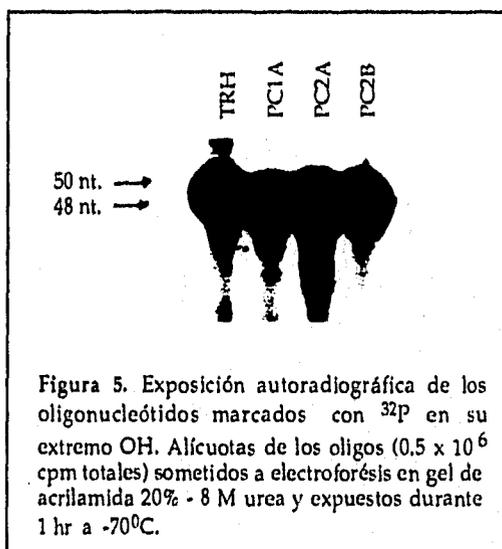
En los experimentos de doble hibridación, la reacción que se genera con la sonda colorida no siempre es fácil de identificar en el monitor, sobre todo en las células que presentan menor señal; por ello fué importante verificar con el ocular del microscopio todo lo que se detectó en la imagen amplificada del monitor de T.V. Como estos tejidos contuvieron al mismo tiempo la señal para los 2 mensajeros de interés (señal colorida y señal radiactiva), los objetos que se trazaron en estos mapas se clasificaron con 2 categorías; de esta manera, al hacer la impresión de los mapas las células que fueron positivas a los 2 RNAs mensajeros estuvieron señaladas con las 2 categorías. El porcentaje de colocación se midió con respecto al número total de células TRHérgicas.

RESULTADOS

1. Detección de los RNAs mensajeros de TRH, PC1, PC2 y CRF por hibridación *in situ* empleando oligonucleótidos.

1. 1 Oligonucleótidos sintéticos

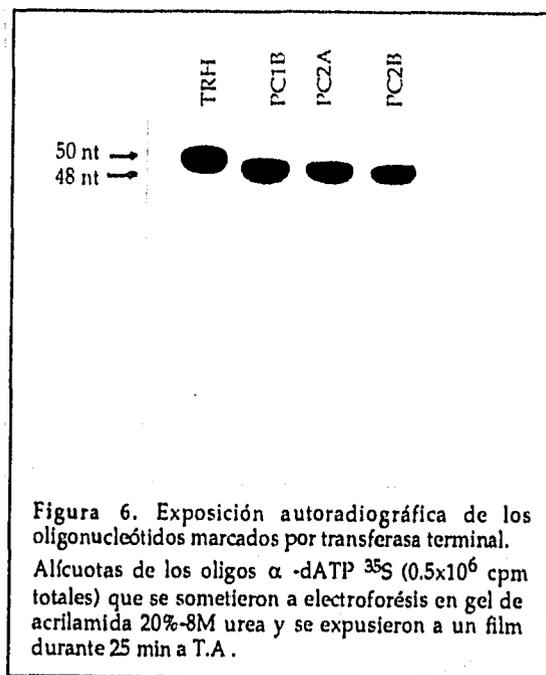
Los resultados obtenidos con los oligos recién sintetizados, se compararon con los obtenidos para el oligo de TRH ya que este último se utiliza rutinariamente en el laboratorio y es por ello que se utilizó como control para verificar la concentración y pureza de los oligos restantes. De las reacciones de fosforilación con los distintos oligos, se obtuvieron porcentajes de incorporación entre 35 y 40% que son similares a los porcentajes obtenidos para el oligo de TRH. También se realizó la electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes con alícuotas de las distintas reacciones (sin previa precipitación) y con alícuotas de los oligos sin marcar. La figura 5 muestra una autoradiografía representativa de los oligos radiactivos en donde se detecta la presencia de una banda mayoritaria para cada oligo; la señal en el film correspondió a los tamaños esperados. Para los oligos de PC1B y CRF la señal del film también fue la esperada (no señalado). Los carriles de los oligos sin marcar se tiñieron con bromuro de etidio y se observaron en una pantalla de sílica gel para verificar que los tamaños y las concentraciones de los mismos fueran los adecuados y también para verificar que no estuvieran degradados; todos los oligos se encontraron en las concentraciones esperadas y no se observó degradación de los mismos.



1. 2 Marcado de los oligos por transferasa terminal

Los oligonucleótidos descritos en el párrafo anterior, se marcaron radiactivamente por una reacción con transferasa terminal para ser utilizados en los ensayos de hibridación *in situ*. Al término de las reacciones se tomaron alícuotas de los oligos y se corrieron en geles en condiciones desnaturalizantes. La figura 6 muestra la autoradiografía de las reacciones para algunos de los oligos y se compara con la señal del oligo de TRH marcado por la misma reacción. La señal para los oligos de PC1A y

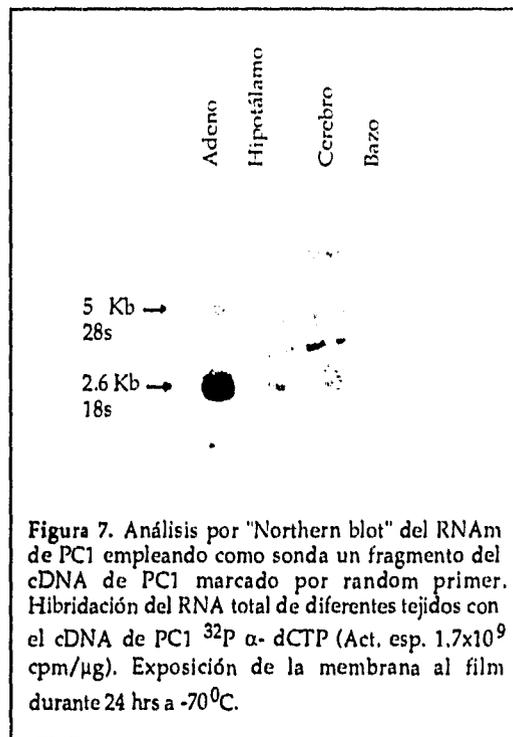
CRF correspondió con lo esperado (no señalado); el porcentaje de incorporación del nucleótido radiactivo en todas las reacciones realizadas con los oligos estuvo en un rango de 85 a 90% (con actividades específicas entre 4.5 y 8.0×10^8 cpm/ μg) al igual que lo que se obtiene para el oligo de TRH.



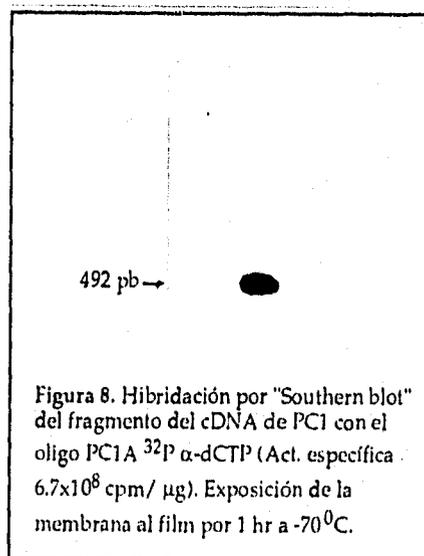
1.3 Análisis por "Northern blot" de la señal de PC1

Previo a los ensayos de hibridación *in situ* se intentó verificar por "Northern blot" que los oligos dieran el patrón de bandas que se obtiene cuando se hibrida con el cDNA de PC1; al mismo tiempo, se realizó un "Northern blot" con RNA total de diferentes tejidos (hipotálamo, cerebro, adenohipófisis y bazo) en los que se utilizó como sonda el fragmento del cDNA de PC1 marcado con [^{32}P].

Los resultados obtenidos con el cDNA fueron similares a lo reportado por otros autores. En la figura 7 se muestra una autoradiografía de la membrana del blot; todos los tejidos que contienen al RNAm de PC1 presentan las 2 poblaciones de RNAm: 2600 y 5000 pb. La señal de hibridación para la población de RNAm de 2600pb fué más intensa en la adenohipófisis que en los otros tejidos; el RNA total de bazo se utilizó como control negativo en el ensayo de hibridación. La integridad del RNA total en todos los tejidos, se verificó por tinción en el gel con bromuro de etidio (no señalado).



Con los oligonucleótidos dirigidos al RNAm de PC1 no fué posible detectar la señal que se obtuvo por "Northern blot" con el fragmento de PC1. Sin embargo al hibridar los oligos marcados contra su cDNA por "Southern blot", la señal que se obtuvo fué muy intensa y mostró la especificidad de los oligos hacia su blanco. La figura 8 muestra la hibridación de PC1A contra su cDNA; la señal obtenida con el oligo B fué similar (no señalado). Por los resultados obtenidos con los oligos de PC1 en estos ensayos, se decidió emplear a ambos para los ensayos de hibridación *in situ*.



1. 4 Hibridaciones *in situ*

Al demostrar que los oligos de PC1 hibridaban contra su cDNA, se procedió a realizar los ensayos de hibridación *in situ*. Debido a las dificultades que se presentaron con el "Northern blot" para obtener la señal de PC1, decidimos determinar la especificidad de los oligos para PC2 directamente en los ensayos de hibridación *in situ*. Los controles para los oligos de PC1 y de PC2 se realizaron en cortes de tejido de cerebro y de hipófisis fijados en paraformaldehído. La figura 9 muestra un ensayo de hibridación encortes de cerebro, en donde el RNAm de PC1 (figura 9A) se detecta con el oligo PC1A, en algunas capas de la corteza cerebral y en los núcleos supraóptico, periventricular y paraventricular del hipotálamo; la hibridación para el RNAm de PC2 con el oligo PC2A, se detecta en algunas capas de la corteza cerebral, algunas capas del hipocampo, habénula, tálamo y núcleo paraventricular del hipotálamo (figura 9B). El patrón de distribución para ambos RNAs mensajeros se repitió al hibridar con los oligos B (no señalado) y fué similar a lo anteriormente reportado (33).

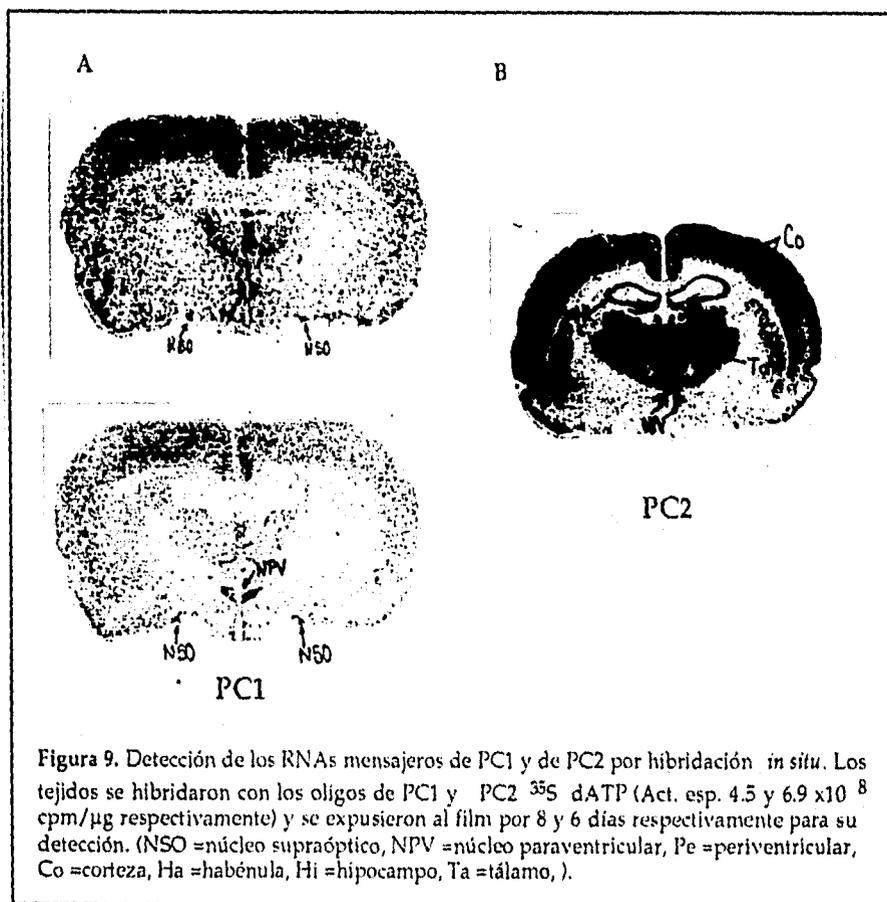
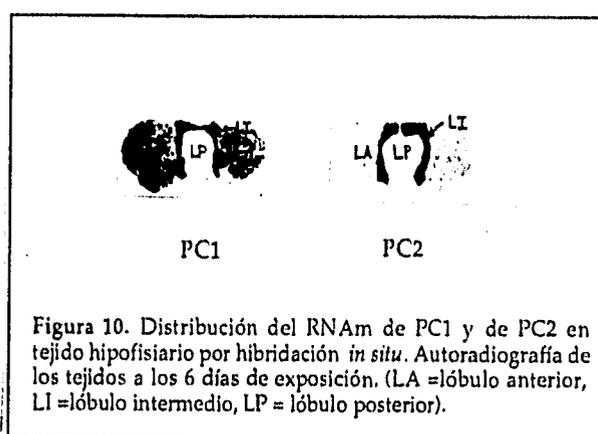


Figura 9. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 por hibridación *in situ*. Los tejidos se hibridaron con los oligos de PC1 y PC2 ^{35}S dATP (Act. esp. 4.5 y 6.9×10^8 cpm/ μg respectivamente) y se expusieron al film por 8 y 6 días respectivamente para su detección. (NSO =núcleo supraóptico, NPV =núcleo paraventricular, Pe =periventricular, Co =corteza, Ha =habénula, Hi =hipocampo, Ta =tálamo,).

Los ensayos de hibridación en tejido hipofisario también corroboraron la especificidad de los oligos hacia su blanco. En la figura 10 se observa que la señal obtenida para el RNAm de PC1 está enriquecida en el lóbulo anterior y en lóbulo intermedio mientras que la señal para el RNAm de PC2 se encuentra enriquecida únicamente en el lóbulo intermedio; en el lóbulo posterior no se detectó señal de hibridación para ninguno de los RNAs mensajeros. La distribución del RNAm de PC1 (con los oligos A ó B) y de PC2 (con los oligos A ó B) fué la esperada y correspondió con lo anteriormente reportado (49).



Otra manera de determinar si la hibridación era específica, consistió en realizar ensayos de desplazamiento de la señal. A la mezcla de hibridación que contiene al oligo marcado, se le adiciona un exceso de 10 veces del mismo oligo sin marcar (oligo frío) ó un oligo en exceso de 10 veces de un oligo que no esté relacionado con los RNAs mensajeros de las convertasas. Como se puede ver en la figura 11A, al utilizar el oligo frío de PC1A en exceso, la señal que se obtiene para PC1 en ausencia de éste es desplazada; cuando se adiciona un exceso de oligo frío de TRH (que hibrida con su RNAm bajo las mismas condiciones del ensayo para PC1), no se observa desplazamiento de la señal (figura 11B).

Todos los controles de especificidad en tejido cerebral, se realizaron en cortes coronales de 20 micras de grosor; sin embargo, como el objetivo de los ensayos era realizar la colocalización de los RNAs mensajeros en los cortes contiguos, se decidió hacer cortes de tejido más finos (10 micras) con el fin de aumentar la posibilidad de detección en los 2 cortes.

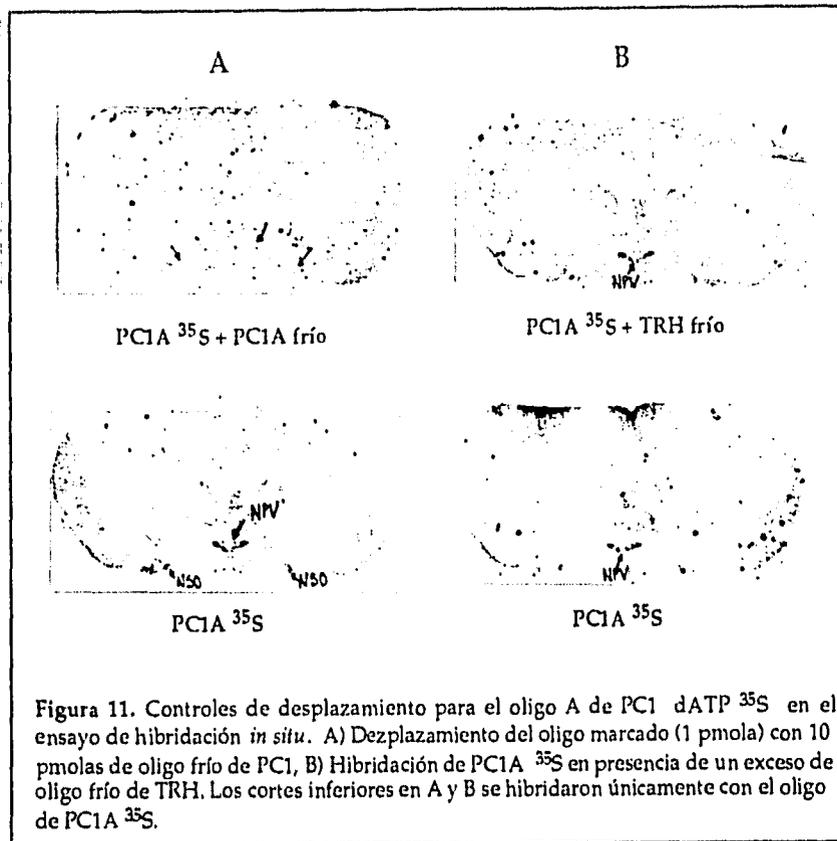


Figura 11. Controles de desplazamiento para el oligo A de PC1 dATP ³⁵S en el ensayo de hibridación *in situ*. A) Desplazamiento del oligo marcado (1 pmola) con 10 pmolas de oligo frío de PC1, B) Hibridación de PCIA ³⁵S en presencia de un exceso de oligo frío de TRH. Los cortes inferiores en A y B se hibridaron únicamente con el oligo de PCIA ³⁵S.

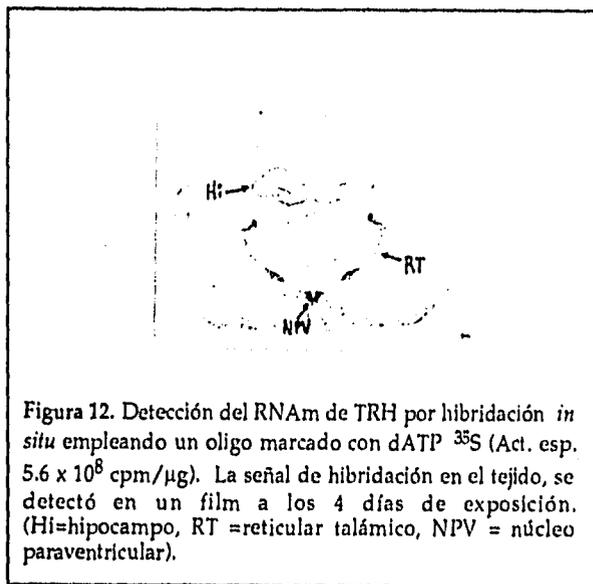
Los ensayos de PC1 se realizaron con 0.7 y 1 pmolas/ml del oligo A dATP [³⁵S] en la mezcla de hibridación; la actividad específica del oligo fué de 0.45 - 1.5 x 10⁹ cpm/μg. La señal en el NPV a los 8 días de exposición al film fué mejor con 1 pmola que con 0.7 pmolas, por lo tanto en lo sucesivo se empleó 1 pmola del oligo para detectar al RNAm de PC1 en el ensayo de hibridación. Para identificar al RNAm de PC1 a nivel celular, el tiempo de exposición de los tejidos a la emulsión fotográfica fué de 31 días.

Para el oligo A de PC2 la señal de hibridación también se detectó mejor con 1 pmola; la actividad específica del oligo dATP [³⁵S] estuvo entre 6.9 - 8.6 x10⁸ cpm/μg. La señal de hibridación en el film se observó a los 6 días y el tiempo de exposición a la emulsión fotográfica fué de 23 días.

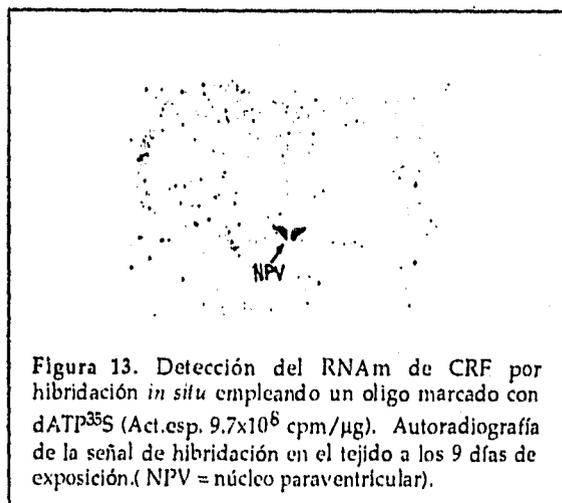
Dado que se requería mucho tiempo para detectar la señal a nivel celular cuando se empleaba un sólo oligo - exposición al film + exposición a la emulsión fotográfica-, se decidió utilizar el par de los oligos para cada RNAm en un mismo ensayo, con el fin de disminuir los tiempos de exposición. El patrón de la señal con los oligos B, fué igual al que se obtuvo con los oligos A (no mostrado).

Al emplear a los dos oligos que reconocen al RNAm de la PC2 en el ensayo, los tiempos de exposición disminuyeron considerablemente: el tiempo de exposición al film fué de 4 días mientras que el tiempo de exposición a la emulsión disminuyó a 15 días. Para la PC1, la señal que se obtuvo con los dos oligos en 6 días de exposición fué baja, por lo menos en la zona de interés.

La hibridación *in situ* para el RNAm de TRH ya había sido estandarizada en el laboratorio y por lo tanto los ensayos se realizaron empleando 1 pmola de oligo marcado con dATP [³⁵S] en la mezcla de hibridación cuya actividad específica fluctuó entre 0.45 - 1.6 x 10⁹ cpm/μg. El tiempo de exposición al film fué de 4 días en promedio y el tiempo de exposición a la emulsión fotográfica fué de 15 días. La figura 12 muestra un ensayo de hibridación con el oligo de TRH en donde se observa que la distribución del RNAm de TRH a este nivel, se limita al NPV del hipotálamo, núcleo reticular talámico y algunas capas del hipocampo.



Los ensayos de hibridación con el RNAm de CRF se realizaron bajo las condiciones anteriormente reportadas (91). Únicamente se hicieron algunos ensayos de prueba para optimizar el ensayo en el laboratorio. Se utilizó 1 pmola de oligo marcado con dATP [³⁵S] cuya actividad específica varió de 8.5 - 9.7 x10⁸ cpm/μg. El tiempo de exposición al film fué de 9 días, mientras que la exposición a la emulsión fotográfica fué de 17 días. La fotografía de la figura 13 muestra la hibridación del RNAm de CRF con el oligo radiactivo; a este nivel, la señal para CRF sólo se observa en el NPV.



2. Hibridaciones *in situ* empleando transcritos de cRNA

2.1 Transcripciones *in vitro* para los cRNAs de TRH, PC1 y PC2

Debido a los largos tiempos de exposición de los tejidos para detectar la señal a nivel celular (exposición a la emulsión fotográfica), cuando se emplearon los oligos, se decidió utilizar cRNAs radiactivos con el fin de aumentar la actividad específica de las sondas y de esta manera mejorar la sensibilidad en los ensayos.

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* de los cRNAs, se utilizaron fragmentos de los cDNAs respectivos que se encuentran clonados en diferentes plásmidos (PC1 de las bases 715 - 1206 clonado en bluescript+, PC2 de las bases 878 - 1326 clonado en bluescript+, TRH de las bases clonado en pGEM2); previamente se realizó la amplificación, purificación y linearización de los plásmidos, así como la purificación de los fragmentos. Las transcripciones *in vitro* se realizaron empleando α -UTP [^{33}P]; la actividad específica de los transcritos fluctuó entre $1.2\text{-}2.0 \times 10^9$ cpm/ μg . Por electroforesis en gel en condiciones desnaturizantes se verificó que los tamaños de los transcritos fueran los adecuados. La figura 14 muestra la autoradiografía de los transcritos sometidos a electroforesis en gel; la banda mayoritaria para los transcritos de PC1 y de PC2 migró por debajo del marcador de 0.530 pb, lo cual se aproxima al tamaño de los fragmentos esperados (492pb y 450 pb respectivamente); para el transcrito de TRH se obtuvo una banda que migró por debajo del marcador de 1.280pb que se aproxima al tamaño del fragmento esperado (1200pb) y una banda que migró entre los marcadores de 0.530- 0.780; esta banda corresponde a un fragmento de aproximadamente 700pb y posiblemente corresponde a transcritos incompletos. No se observó degradación de los transcritos.

Una vez obtenidos los transcritos, se realizaron los ensayos de hibridación *in situ*; las condiciones de hibridación con los tres transcritos fueron similares (ver métodos). En estos ensayos, el tiempo de exposición al film para todos los transcritos, disminuyó considerablemente: 40 hrs de exposición.

Considerando que la señal obtenida con los oligos para detectar a los RNAs mensajeros de TRH y de PC2 era adecuada y debido al alto costo que representa el emplear transcritos radiactivos en los ensayos de hibridación, se optó por seguir utilizando oligonucleótidos para los ensayos de hibridación; sólo para los ensayos con PC1 se emplearon transcritos radiactivos. La figura 15 muestra la intensidad de la señal que se obtuvo con el transcrito para PC1.

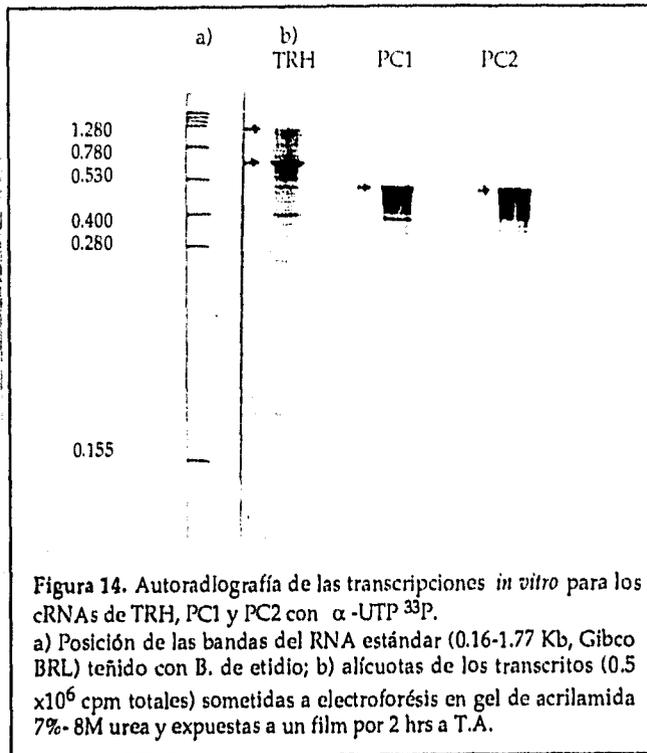


Figura 14. Autoradiografía de las transcripciones *in vitro* para los cRNAs de TRH, PC1 y PC2 con α -UTP ^{33}P .
a) Posición de las bandas del RNA estándar (0.16-1.77 Kb, Gibco BRL) teñido con B. de etidio; b) alícuotas de los transcritos (0.5×10^6 cpm totales) sometidas a electroforesis en gel de acrilamida 7%- 8M urea y expuestas a un film por 2 hrs a T.A.

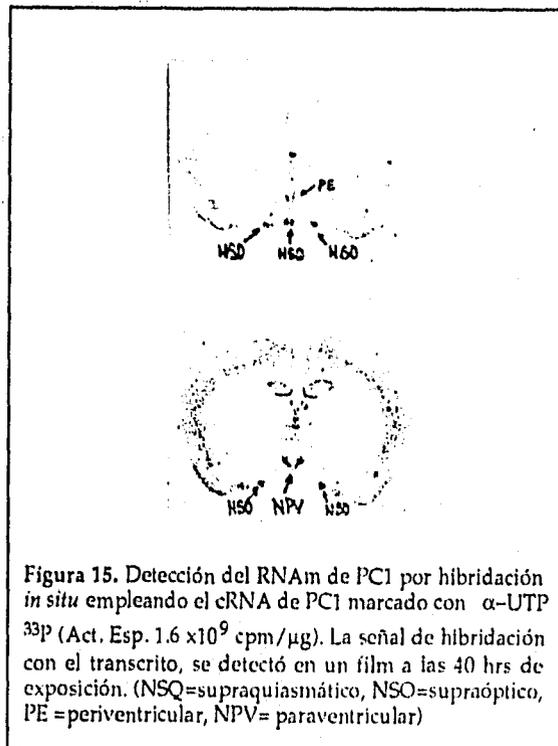


Figura 15. Detección del RNAm de PC1 por hibridación *in situ* empleando el cRNA de PC1 marcado con α -UTP ^{33}P (Act. Esp. 1.6×10^9 cpm/ μg). La señal de hibridación con el transcrito, se detectó en un film a las 40 hrs de exposición. (NSQ=supraquiasmático, NSO=supraóptico, PE=periventricular, NPV= paraventricular)

3. Detección de los RNAs mensajeros de TRH -TRH, TRH -PC1, TRH -PC2 ó TRH-CRF en cortes de cerebro contiguos.

De los ensayos de hibridación realizados para detectar a los RNAs mensajeros de TRH-PC1, TRH-PC2, TRH-TRH ó TRH-CRF (NPV de un cerebro/ensayo) se eligieron los pares de las rebanadas que se encontraron en mejor estado tanto morfológicamente como en la señal de hibridación.

Las laminillas elegidas se analizaron al microscopio de luz y la señal para el RNAm se cuantificó empleando un analizador de imágenes adaptado al microscopio. De cada laminilla, se trazó un mapa que comprende al NPV y al tercer ventrículo y posteriormente se marcaron las células positivas al RNAm de interés (en forma de símbolos) dentro de la zona que delimita al NPV. Posteriormente se imprimieron todos los mapas para realizar los empalmes correspondientes en forma manual ó se realizaron los empalmes de forma automática.

Una de las primeras preguntas que surgieron al hacer los ensayos con las rebanadas contiguas fué si se detectarían o no las mismas neuronas TRHérgicas en 2 cortes contiguos de 10 μm de grosor. También era importante conocer cual era el porcentaje máximo de detección que debería de esperarse al hacer los empalmes. Con el fin de responder a éstas preguntas, se realizó un ensayo en el que se hibridaron todos los cortes del NPV con el oligo de TRH.

En todos los pares analizados a este grosor de corte, se detectaron células TRHérgicas que coincidieron en los dos cortes. La mayoría de las células TRHérgicas del NPV se encontraron a lo largo de la región parvocelular con un número escaso en la región magnocelular.

La región parvocelular mostró un patrón claro de distribución: en la zona anterior (ó rostral del NPV) las células se encontraron totalmente dispersas mientras que, en la zona media (segundo tercio del NPV) se observó una mayor concentración a lo largo del tercer ventrículo; hacia la parte posterior del NPV (ó caudal), las neuronas TRHérgicas de la zona media, se localizaron sólo en la parte dorsal (figura 16). Los resultados se agruparon como región anterior (A), que corresponde a la zona anterior parvocelular (rostral del NPV) y como región media (M), que corresponde a la zona media parvocelular y que va desde el segundo tercio del NPV hasta la zona caudal del mismo. El porcentaje de coincidencia se determinó tomando como referencia el número total de células TRHérgicas de una de las laminillas /par cuantificado; el número total de células TRHérgicas/ rebanada ($n=11$) fué de 132.6 ± 9.2 (media \pm error estándar de la media -ESM-).

El porcentaje de coincidencias en 2 cortes contiguos en la región anterior del NPV fué en promedio de $5\% \pm 0.5$ ESM ($n=2$), mientras que en la región media fué del $13\% \pm 2.7$ ESM ($n=4$); La figura 17 muestra tanto el número de células de TRH que se detectaron por laminilla así como los porcentajes de coincidencia de neuronas TRHérgicas en los cortes contiguos del NPV.

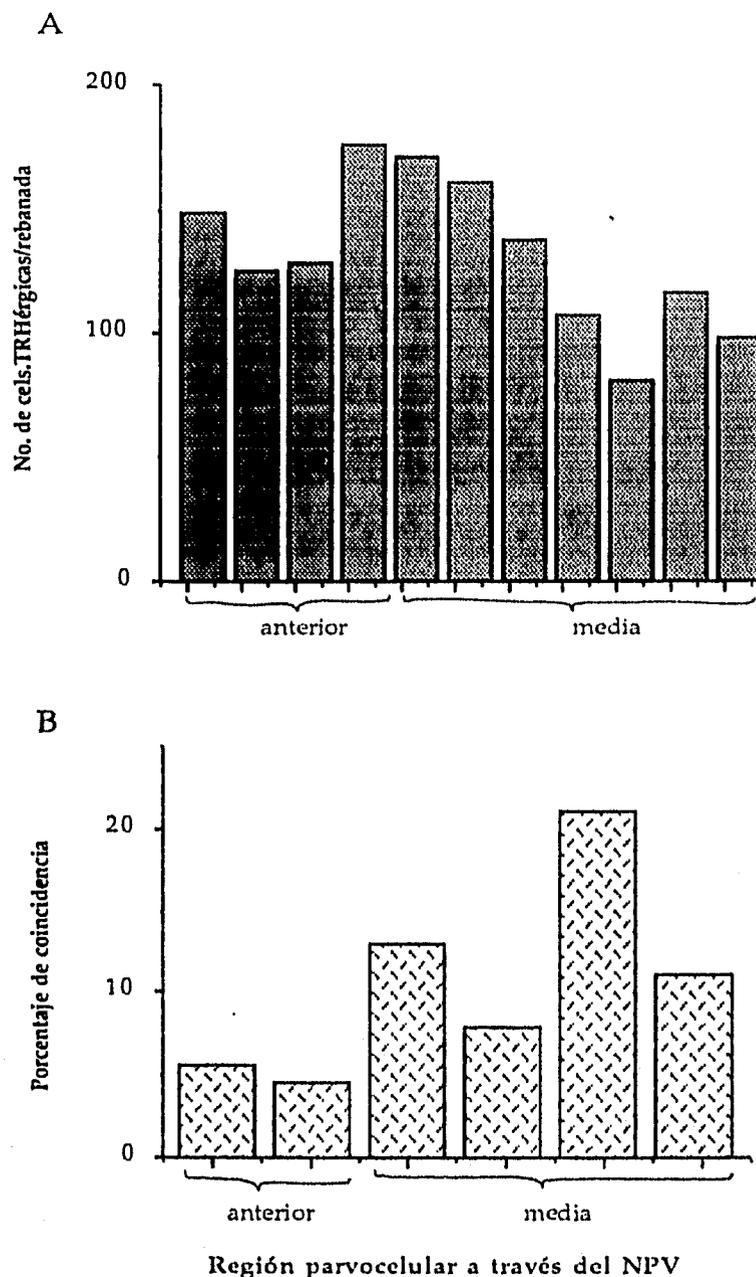


Figura 17. Detección de neuronas TRHérgicas del NPV en dos cortes de cerebro contiguos. De las células positivas al RNAm de TRH en el NPV, se trazaron mapas (1 mapa/laminilla analizada), con los que posteriormente se realizaron los empalmes manuales correspondientes a los cortes contiguos. A: Número total de células TRHérgicas / laminilla, B: Porcentaje de neuronas encontradas en 2 cortes contiguos .

En la figura 18 se presenta uno de los cortes de tejido que se hibridaron con el oligo de TRH [³⁵S]; las células positivas presentan la señal para el RNAm de TRH cerca de sus núcleos después de haber expuesto los tejidos a la emulsión fotográfica.

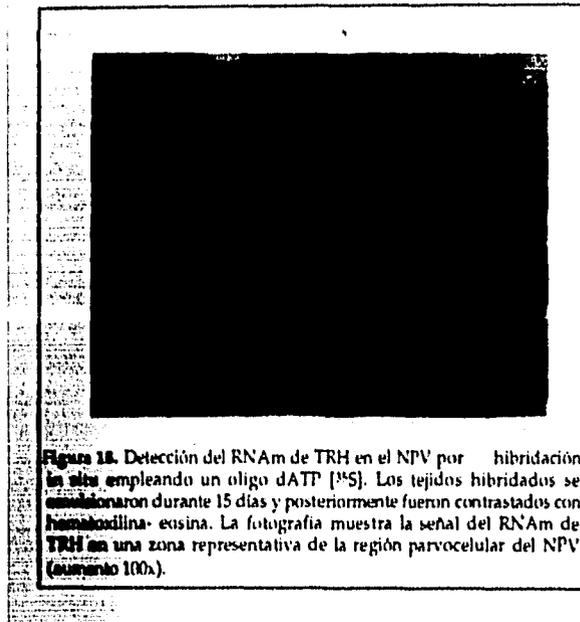


Figura 18. Detección del RNAm de TRH en el NPV por hibridación *in situ* empleando un oligo dATP [³⁵S]. Los tejidos hibridados se emulsionaron durante 15 días y posteriormente fueron contrastados con hemalodina-eosina. La fotografía muestra la señal del RNAm de TRH en una zona representativa de la región parvocelular del NPV (aumento 100x).

Para validar los resultados obtenidos con el empalme manual, se eligieron algunos de los pares y se analizaron con el programa de forma automática. La comparación de ambos resultados se muestra en la tabla 1. El número de células que se contaron en ambos casos fué similar y en promedio, el 80% de las células contadas con el empalme manual coincide con el que se contó en forma automática.

Tabla 1. Eventos de coincidencia de neuronas TRHérgicas del NPV en rebanadas contiguas de cerebro de rata por hibridación <i>in situ</i> .			
Región del NPV	No. total de células TRHérgicas	No. de células que coexisten	
		manual	automático
A	125	7	7
A	176	8	11
M	137	11	10
M	81	17	18
M	98	13	14

Para corroborar que los eventos cuantificados no eran aleatorios, se realizó un ensayo de hibridación de TRH con CRF, porque el RNAm de CRF se encuentra en la región parvocelular del NPV y porque no coexiste con el RNAm de TRH. La figura 19 muestra fotografías representativas de células positivas a los RNAs mensajeros de TRH y de CRF en el ensayo de hibridación.

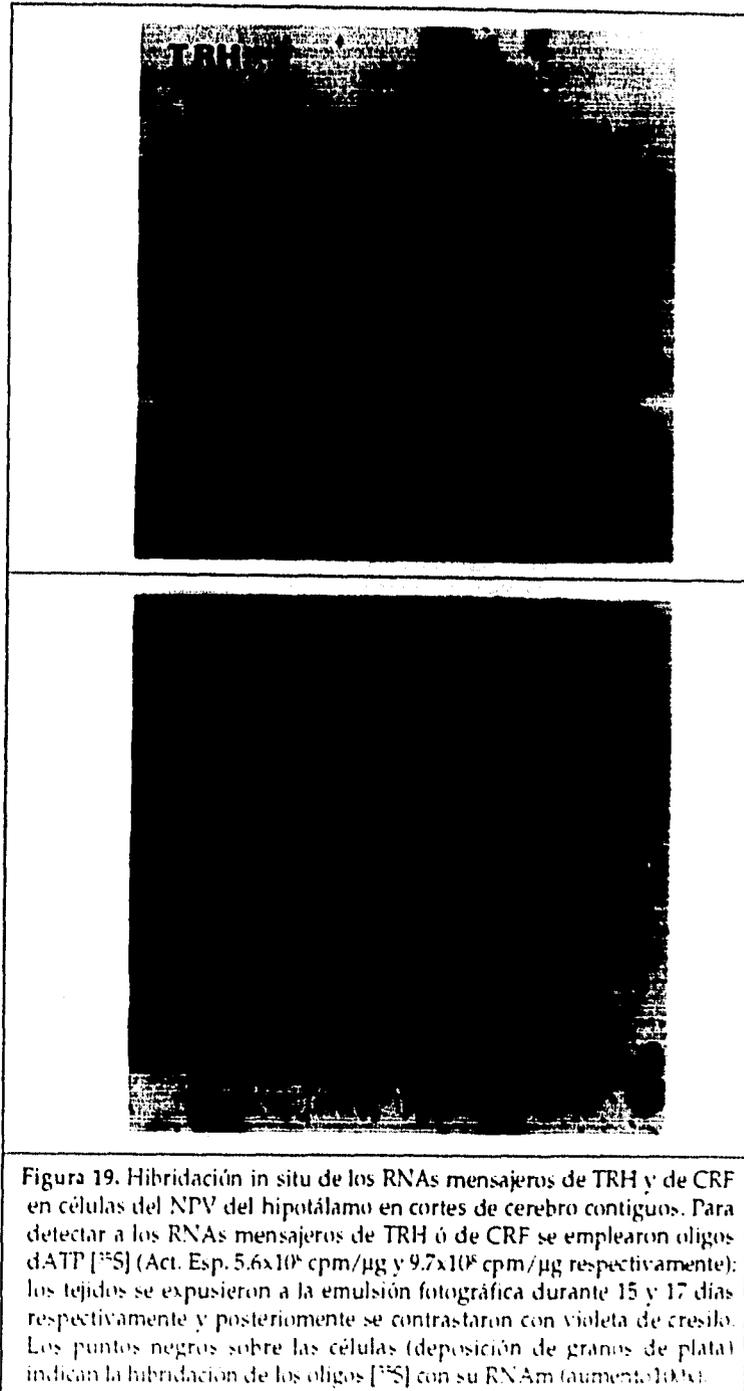


Figura 19. Hibridación in situ de los RNAs mensajeros de TRH y de CRF en células del NPV del hipotálamo en cortes de cerebro contiguos. Para detectar a los RNAs mensajeros de TRH ó de CRF se emplearon oligos dATP [³⁵S] (Act. Esp. 5.6×10^8 cpm/ μ g y 9.7×10^8 cpm/ μ g respectivamente); los tejidos se expusieron a la emulsión fotográfica durante 15 y 17 días respectivamente y posteriormente se contrastaron con violeta de cresilo. Los puntos negros sobre las células (deposición de granos de plata) indican la hibridación de los oligos [³⁵S] con su RNAm (aumento 100x).

Al realizar los empalmes de las rebanadas contiguas en los que se detecta a los RNAs mensajeros de TRH y de CRF se encontró, que el número de células que coinciden a lo largo del NPV fué bajo; en la región anterior el porcentaje promedio de células detectadas en dos cortes contiguos fué de $2.3\% \pm 0.2$ ESM ($n= 4$) y en la región media fué de $2.9\% \pm 0.2$ ESM ($n= 9$). El porcentaje de los eventos de coincidencia, detectados en ambas regiones, se compara en la figura 20 con el porcentaje de los eventos de coincidencia del ensayo TRH-TRH.

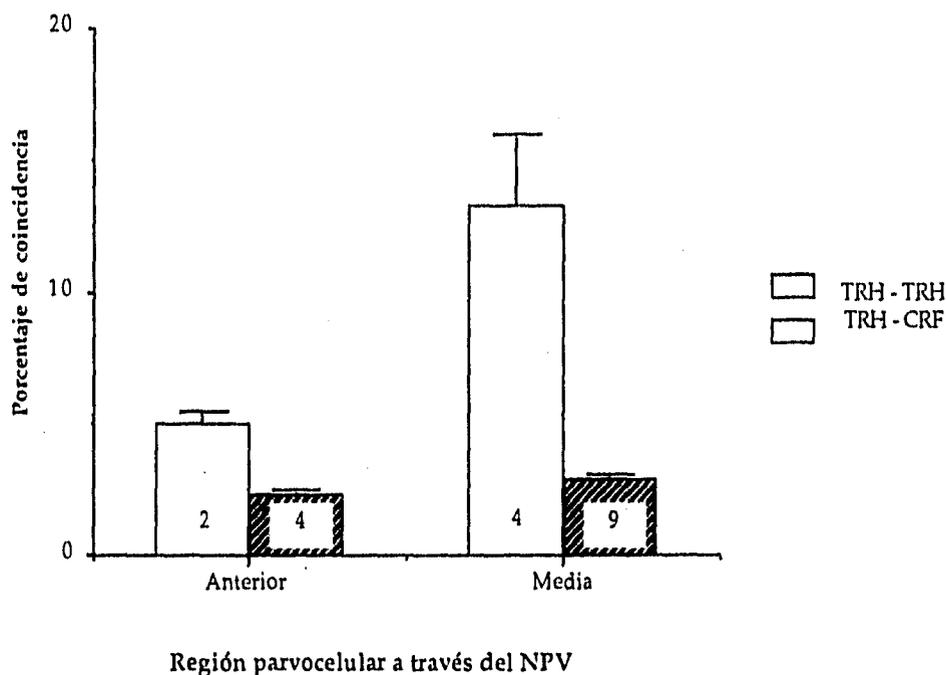


Figura 20. Coincidencias de neuronas TRHérgicas con TRHérgicas y de neuronas TRHérgicas con neuronas de CRF en cortes de cerebro contiguos del NPV. El porcentaje de células detectadas en dos cortes contiguos se obtuvo con respecto al No. total de células de TRH en una laminilla/par analizado; las barras representan el porcentaje promedio del número total de localizaciones en los cortes contiguos. El total de pares analizados en cada grupo (n) se representa al centro de las barras y el error estándar de la media (ESM) también se señala.

Los resultados obtenidos con los empalmes de TRH y de CRF mostraron que, dentro del número de células que se cuentan como positivas en los cortes contiguos, existe una fracción que se cuenta al azar. Al restar el porcentaje promedio de los eventos detectados en el ensayo de TRH con CRF al ensayo de TRH-TRH, se encontró que el porcentaje promedio de neuronas TRHérgicas detectadas en dos cortes contiguos en la región parvocelular anterior fué de $2.7\% \pm 0.5$ ESM ($n= 2$) y en la región media fué de $10.4\% \pm 2.7$ ESM ($n= 4$).

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en los ensayos de hibridación de TRH - TRH y de TRH - CRF, se procedió a realizar la detección de los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 en las neuronas TRHérgicas del NPV.

En los ensayos de hibridación de TRH con PC1 ó TRH con PC2 se encontró que dentro del NPV los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 se localizan en células que sintetizan TRH. En la figura 21 se muestran fotografías representativas de células positivas a los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 en el NPV.

En la región parvocelular anterior el RNAm de PC1 se detectó en el $5 \% \pm 1.9$ ESM (n= 4) de las neuronas TRHérgicas y en la región media en el $7.6 \% \pm 1.0$ ESM (n= 4); el RNAm de PC2 se detectó en el $10.1\% \pm 2.2$ ESM (n= 5) de las neuronas TRHérgicas de la región parvocelular media. En ambos ensayos se restaron los valores obtenidos para el CRF tanto para la parte anterior como para la parte media (2.3% y 2.9% respectivamente). El resultado global de los eventos detectados en ambos ensayos se muestra en la figura 22; los valores obtenidos para ambos ensayos, se grafican con respecto al ensayo de detección de neuronas TRHérgicas en cortes contiguos (tomando los valores corregidos para este ensayo como el 100%).

Como se puede apreciar, en la región parvocelular anterior todas las neuronas TRHérgicas contienen al RNAm de PC1 mientras que en la región parvocelular media sólo el 50% de las neuronas TRHérgicas lo contienen. El RNAm de PC2, se encontró en el 70 % de las neuronas TRHérgicas de la región parvocelular media; la región anterior no se determinó.

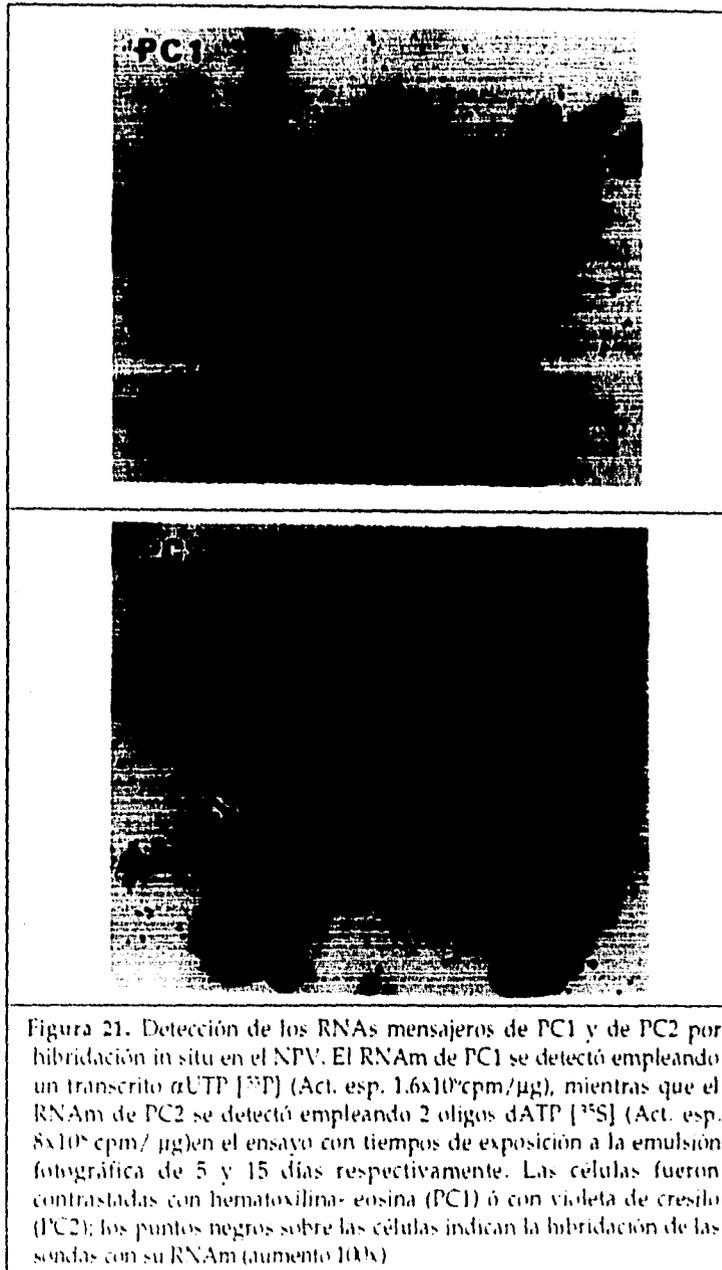


Figura 21. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 por hibridación in situ en el NPV. El RNAm de PC1 se detectó empleando un transcrito α UTP [32 P] (Act. esp. 1.6×10^6 cpm/ μ g), mientras que el RNAm de PC2 se detectó empleando 2 oligos dATP [35 S] (Act. esp. 8×10^6 cpm/ μ g) en el ensayo con tiempos de exposición a la emulsión fotográfica de 5 y 15 días respectivamente. Las células fueron contrastadas con hematoxilina-eosina (PC1) ó con violeta de cresilo (PC2); los puntos negros sobre las células indican la hibridación de las sondas con su RNAm (aumento 100x)

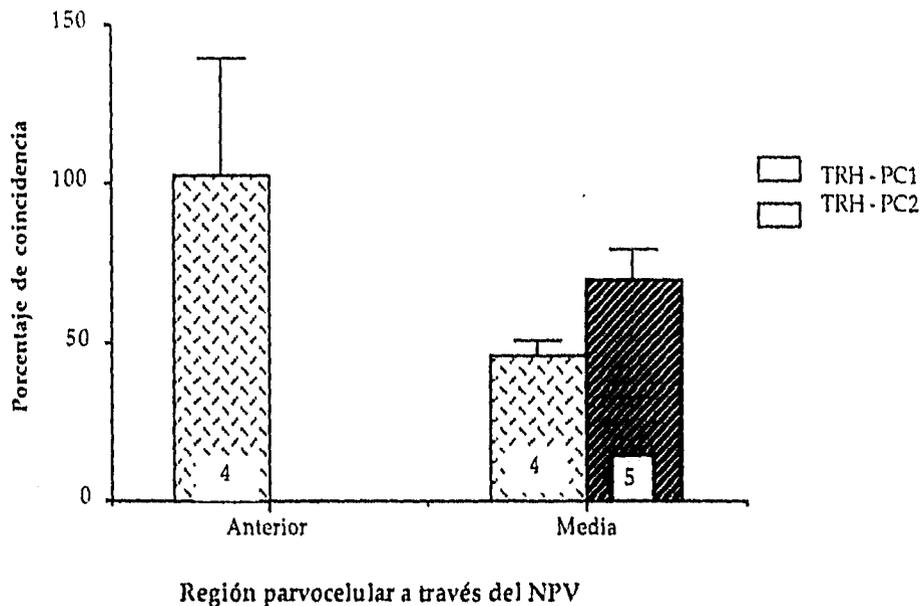


Figura 22. Representación gráfica del porcentaje promedio de neuronas TRHérgicas que contienen a los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en el NPV. El porcentaje promedio de neuronas TRHérgicas que se detectaron en los ensayos de hibridación en cortes contiguos con los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 se obtuvo tomando como 100% al total de células TRHérgicas que pueden coincidir. El número de pares analizados (n) y el ESM se indica en el centro de las barras; la región anterior no se determinó para PC2.

4. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en las neuronas TRHérgicas del NPV empleando un ensayo de doble hibridación.

Con el fin de corroborar los resultados de colocalización obtenidos en las rebanadas contiguas, la estrategia alterna consistió en implementar los ensayos de doble hibridación. Para detectar a los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en el ensayo de doble hibridación, se emplearon transcritos de cRNA marcados con α -UTP [^{33}P] ó [^{35}S] con alta actividad específica; el RNAm de TRH se detectó con un transcrito de cRNA marcado con α -UTP digoxigenina.

4.1 Detección de la señal colorida con el transcrito de TRH dig

Antes de emplear los transcritos de TRH dig se verificó que se obtuviera la reacción colorida esperada y que las condiciones en las que se encontraran las diferentes alícuotas del cRNA de TRH dig fueran buenas. Los cRNAs marcados con dig se separaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes y posteriormente se transfirieron a una membrana para detectar el color.

En la figura 23 se presenta una alícuota del transcrito de TRH dig que fué transferida

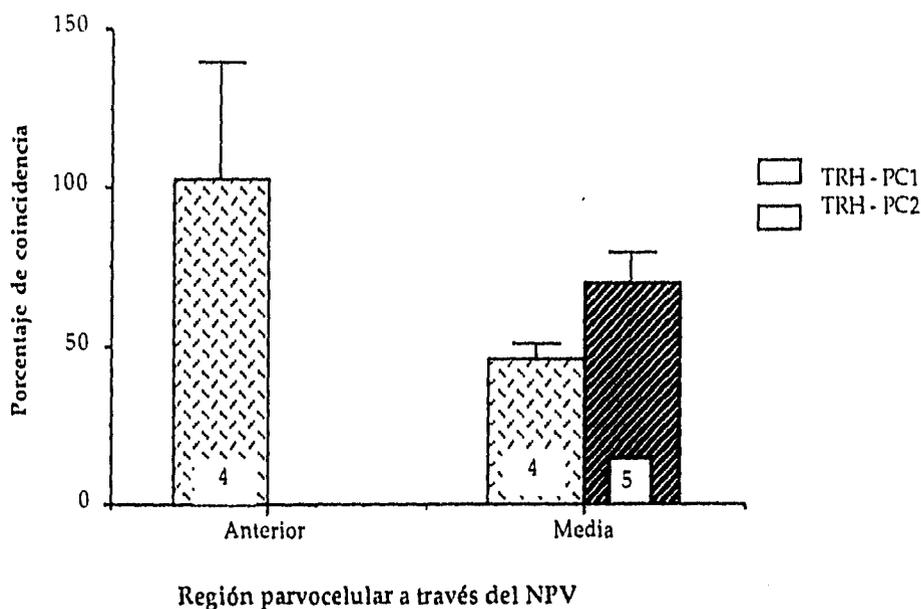


Figura 22. Representación gráfica del porcentaje promedio de neuronas TRHérgicas que contienen a los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en el NPV. El porcentaje promedio de neuronas TRHérgicas que se detectaron en los ensayos de hibridación en cortes contiguos con los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 se obtuvo tomando como 100% al total de células TRHérgicas que pueden coincidir. El número de pares analizados (n) y el ESM se indica en el centro de las barras; la región anterior no se determinó para PC2.

4. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en las neuronas TRHérgicas del NPV empleando un ensayo de doble hibridación.

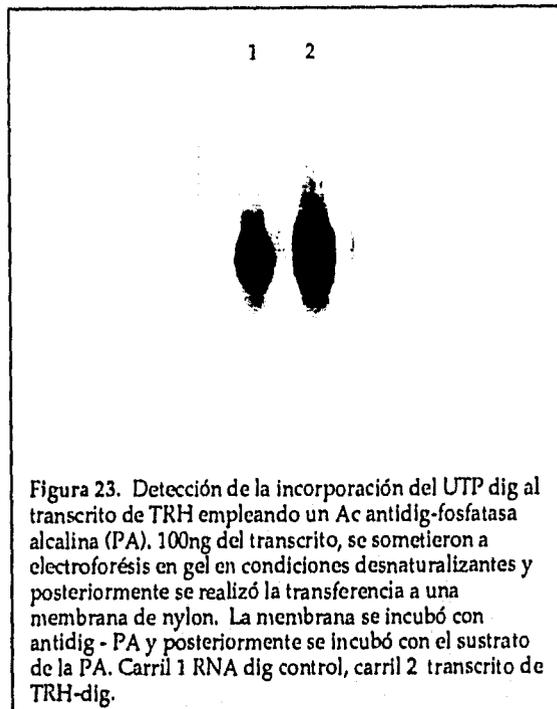
Con el fin de corroborar los resultados de colocación obtenidos en las rebanadas contiguas, la estrategia alterna consistió en implementar los ensayos de doble hibridación. Para detectar a los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en el ensayo de doble hibridación, se emplearon transcritos de cRNA marcados con α -UTP [^{33}P] ó [^{35}S] con alta actividad específica; el RNAm de TRH se detectó con un transcrito de cRNA marcado con α -UTP digoxigenina.

4.1 Detección de la señal colorida con el transcrito de TRH dig

Antes de emplear los transcritos de TRH dig se verificó que se obtuviera la reacción colorida esperada y que las condiciones en las que se encontraran las diferentes alícuotas del cRNA de TRH dig fueran buenas. Los cRNAs marcados con dig se separaron en un gel de agarosa en condiciones desnaturizantes y posteriormente se transfirieron a una membrana para detectar el color.

En la figura 23 se presenta una alícuota del transcrito de TRH dig que fué transferida

junto con un cRNA control de digoxigenina; al incubar la membrana con un anticuerpo antidig fosfatasa alcalina y exponerla posteriormente al sustrato para la enzima, se observó la señal en cada uno de los carriles. El tamaño de los transcritos correspondió al esperado y no hubo degradación en ninguno de los transcritos.



4. 2 Ensayos de doble hibridación

Posteriormente se realizaron los ensayos de doble hibridación en cortes de cerebro de 12 μm que contuvieran al NPV.

De todo el NPV de un cerebro se tomó la mitad de las laminillas (intercaladas) para hibridar TRH con PC1 y la otra mitad para hibridar TRH con PC2; se realizaron 2 ensayos empleando el NPV de una rata por experimento. En el primer ensayo se utilizaron transcritos α -UTP [^{35}S] y la segunda vez transcritos α -UTP [^{33}P]; la actividad específica para los transcritos en ambos ensayos fué similar (1.1-1.5 $\times 10^9$ cpm/ μg). En los mismos ensayos se hibridaron algunas de las laminillas únicamente con los transcritos radiactivos; esto permitió determinar el tiempo de exposición requerido para la emulsión fotográfica.

La señal de hibridación con el transcrito de TRH-dig se detectó por incubación de los tejidos con un anticuerpo Antidig-peroxidasa y posterior exposición al sustrato de la peroxidasa; las células positivas presentaron un precipitado de color café. En las figuras 24 y 25 se presentan fotos representativas de los ensayos de doble hibridación con los transcritos radiactivos de PC1 y de PC2 α -UTP [^{35}S] ó α -UTP [^{33}P]; la señal de hibridación para ambos RNAs mensajeros se observa preferencialmente sobre los citoplasmas de las células.

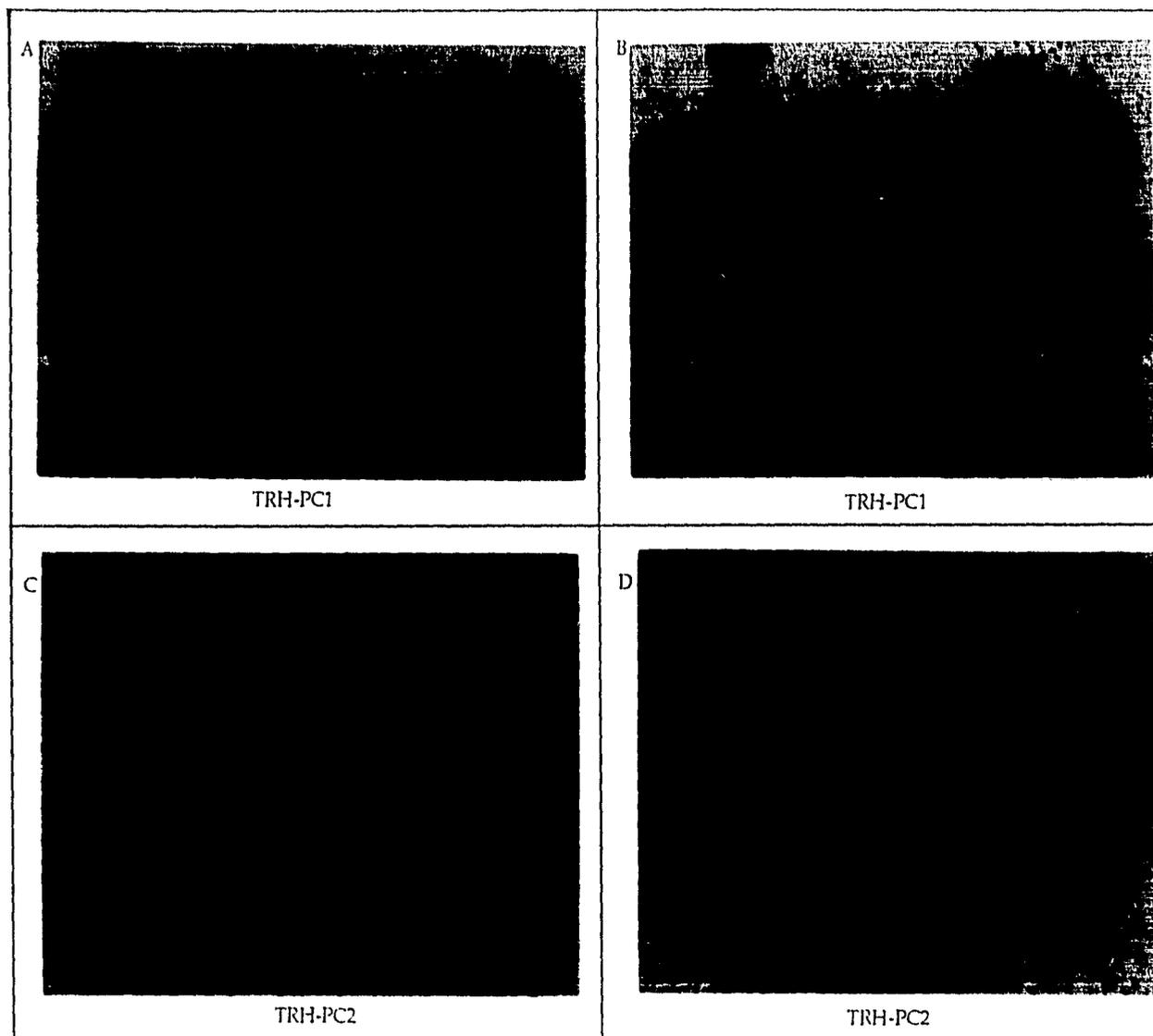


Figura 24. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 o de PC2 en neuronas TRHérgicas del NPV empleando un ensayo de doble hibridación. Los mensajeros de PC1 y de PC2 se detectaron mediante el uso de transcritos α -UTP ^{35}S (Act. esp. 1.6 y 1.8 $\times 10^9$ cpm/ μg respectivamente); los granos sobre el tejido se obtuvieron por exposición a la emulsión fotográfica durante 6 días (A-D). En B y D se presentan 2 cortes del mismo ensayo que fueron contrastados con violeta de cresilo para corroborar la presencia de los granos de plata sobre las células. El RNAm de TRH dig se detectó por incubación con un Ac antidig peroxidasa y posterior exposición al sustrato para la peroxidasa; las células positivas al RNAm presentan un precipitado de color café (A-D).

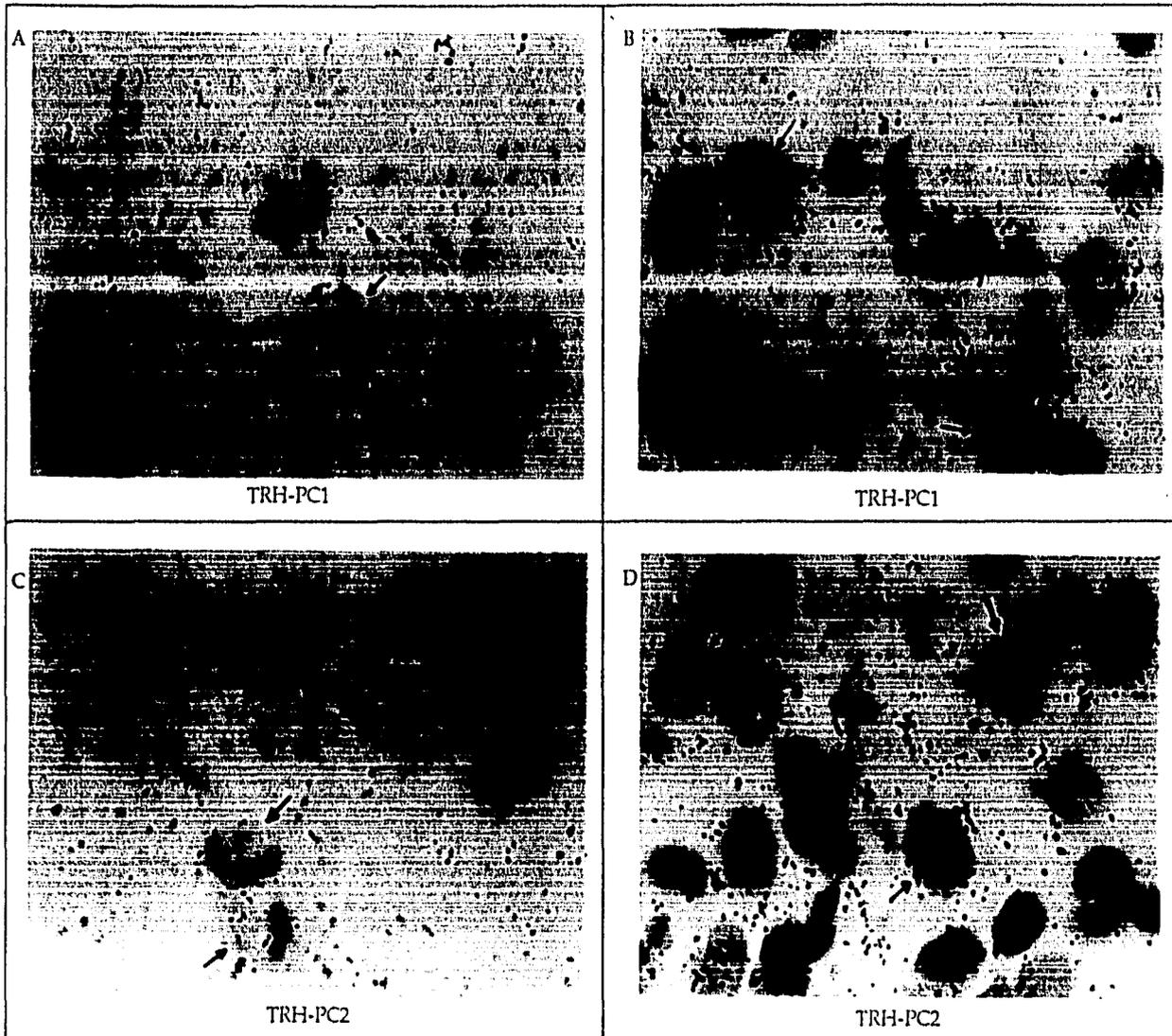


Figura 25. Detección de los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 en neuronas TRHérgicas del NPV empleando un ensayo de doble hibridación. Los mensajeros de PC1 y de PC2 se detectaron empleando transcritos α -UTP ^{33}P (Act. esp. 1.2 y 1.7×10^9 cpm/ μg respectivamente). En el ensayo, el RNAm de TRH dig se detectó empleando un Ac antidig peroxidasa; el precipitado de color café se generó en presencia del sustrato para la peroxidasa (A y C). En B y D se presentan 2 cortes del mismo ensayo que fueron hibridados únicamente con el transcrito radiactivo; los tejidos fueron contrastados con violeta de cresilo para corroborar la presencia de los granos sobre las células. Los granos de plata sobre el tejido se obtuvieron por exposición de los tejidos a la emulsión fotográfica durante 5 días (A-D),

Los ensayos se cuantificaron con el sistema analizador de imágenes; en los mapas generados para cada laminilla se marcaron todas las células positivas al RNAm de TRH (TRHdig) como una categoría y las células que fueron positivas a ambos RNAs mensajeros (TRHdig-PC1 ó PC2) se marcaron con 2 categorías.

El número de células de TRH-Dig/ corte contadas en ambos experimentos fué similar; en promedio se contaron 73.42 ± 25 células en un experimento y 83.36 ± 25 células en el otro. El promedio de células de TRH-Dig contadas en ambos experimentos se compara en la figura 26 con el promedio de células TRHérgicas que se contaron cuando se empleó el oligo dATP [^{35}S] para los diferentes ensayos de localización en cortes contiguos. El número de células/ corte, que se contaron con TRH-Dig fué significativamente menor al número de células contadas/corte en los ensayos de radiactividad (57%, $P < 0.001$).

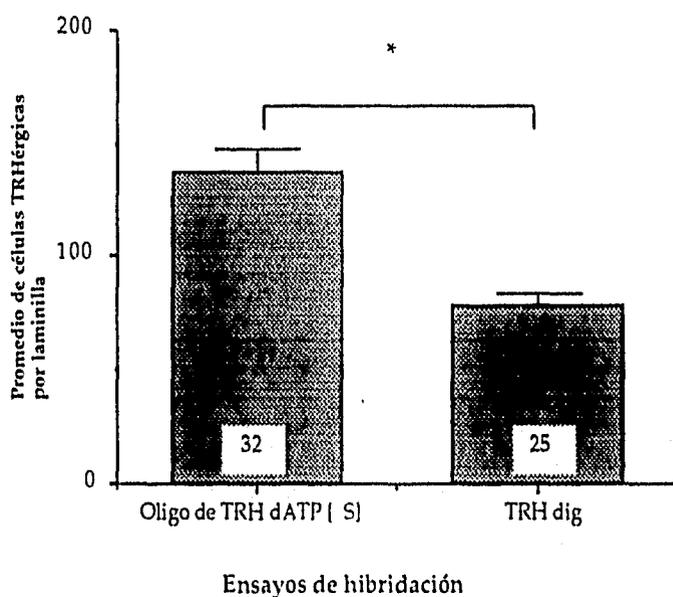


Figura 26. Comparación gráfica del número de células TRHérgicas que se contaron con radiactividad en las hibridaciones de los cortes contiguos y con TRH dig en los ensayos de doble hibridación. Las barras representan el No. promedio de células de TRH/ par analizado en los ensayos de cortes contiguos ó por laminilla en los ensayos de doble hibridación. El número de laminillas analizadas (n) se indica en el centro de las barras y el ESM en la parte superior de las mismas.

El porcentaje promedio de coexistencia en las regiones parvocelular anterior y media del NPV se determinó en base al número total de células de TRH-Dig / rebanada (tabla 2). El porcentaje de neuronas TRHérgicas que coexiste con el RNAm de PC1, fué similar a lo largo del NPV; lo mismo sucede con el porcentaje de células que contiene a PC2 (tabla 2). El número de células TRHérgicas que contiene al RNAm de PC2 también es mayor al número de células TRHérgicas que contiene al RNAm de PC1. Al comparar el número total de colocaciones de los ensayos 1 y 2 se encontró, que el porcentaje de células contadas en el primer ensayo fué mayor al del segundo ensayo.

	PC1	PC2
% de colocalización:		
en el ensayo 1:		
Parvocelular anterior	44.8% ± 1.1	57.9% ± 5.5
Parvocelular media	39.4% ± 3.3	66.5% ± 4.6
% de colocalización:		
en el ensayo 2:		
Parvocelular anterior	22% ± 6.5	39.5% ± 0
Parvocelular media	28.1% ± 2.5	40.6% ± 3.2

Al analizar los cortes de los ensayos de doble hibridación se observó que no todas las regiones del cerebro que expresan al RNAm de TRH expresan a los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2; en las neuronas TRHérgicas del núcleo reticular talámico, no se detectó la señal para estos mensajeros. Además de la coexistencia de las neuronas TRHérgicas del NPV con los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2, también se encontró coexistencia en otras regiones del cerebro como en la zona intermedia al NPV y al fórnix; las neuronas TRHérgicas de esta zona también se cuantificaron.

En esta región se encontró que los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 se encuentran en un mayor número de células TRHérgicas con respecto al NPV. A diferencia de lo observado en el NPV, el RNAm de PC1 se encuentra en un mayor número de células TRHérgicas. El RNAm de PC2 colocaliza con el RNAm de TRH en la mayoría de las células de esta región (tabla 3).

	PC1	PC2
% de colocalización		
en el ensayo 1:		
	77.1% ± 5.1	88.5% ± 4.6
% de colocalización		
en el ensayo 2:		
	49.6% ± 8.3	65.3% ± 5.4

Al comparar el no. total de coexistencias de los ensayos 1 y 2 en la región adyacente al fórnix, también se encontró que el número total de células contadas con PC1 ó con PC2 fué menor en el segundo ensayo (aproximadamente el 69% del ensayo anterior).

DISCUSION

El descubrimiento reciente de algunos miembros de la familia de endoproteasas denominada convertasas ha permitido conocer un poco más acerca del procesamiento proteolítico de los precursores peptídicos a nivel de los aa básicos que flanquean a las secuencias peptídicas. Diferentes sistemas de expresión *in vitro*, han mostrado que estas enzimas son capaces de procesar a los precursores en los sitios dibásicos que flanquean a las secuencias peptídicas. También se ha visto que estas enzimas pueden procesar los sitios monobásicos que presentan algunos de los precursores, aunque con menor eficiencia. Dado que *in vivo*, los RNAs mensajeros de las convertasas se encuentran distribuidos en tejidos que sintetizan péptidos, se ha intentado definir si estas enzimas participan del procesamiento de los precursores peptídicos en esos tejidos. Se ha demostrado que algunas de las convertasas se encuentran en el mismo compartimento celular (TGN ó gránulos secretorios) en el que se detecta a los precursores peptídicos completos ó semiprosesados (92). También bajo ciertas condiciones experimentales, se ha observado que ocurren cambios en los niveles de expresión de los precursores peptídicos que correlacionan con cambios en los niveles de expresión de estas enzimas (61). Si bien existen evidencias que apoyan la participación de las convertasas en el procesamiento de los precursores, es necesario determinar con certeza el papel que juegan estas enzimas dentro de la biosíntesis de los péptidos.

Dado que el procesamiento de los precursores pudiera estar limitado por la presencia (ó ausencia) de alguna de estas enzimas en determinados tejidos, es importante conocer cuáles de las enzimas se están sintetizando con el precursor de interés. En el laboratorio estamos interesados en conocer cuales son las enzimas que procesan al precursor del TRH que se sintetiza en el NPV del hipotálamo, porque estamos estudiando la regulación del metabolismo del TRH que participa en la regulación del eje hipotálamo hipofisario.

En este trabajo, el objetivo consistió en investigar si los RNAs mensajeros de PC1 y PC2 se localizan en las neuronas TRHérgicas del NPV porque su distribución en este tejido las señala como posibles candidatas y además porque los antecedentes *in vitro*, señalan que ambas enzimas son capaces de procesar al precursor de TRH (93, 94).

Para ello detectamos a los RNAs mensajeros de interés en cortes contiguos de cerebro. En un primer ensayo se hibridaron los cortes de todo el NPV contra el RNAm de TRH con el fin de determinar el número de eventos de células TRHérgicas que se detectarían en 2 cortes de cerebro contiguos. El número de eventos encontrados fué del 10% y por lo tanto, la probabilidad máxima de detección de los RNAs mensajeros de TRH y PC1 ó TRH y PC2 en las rebanadas contiguas, debería de ser similar a lo encontrado.

En el ensayo de TRH con TRH encontramos, que la distribución de los eventos a lo largo del NPV no fué homogénea, puesto que en la región parvocelular anterior el porcentaje de localización fué del $5\% \pm 0.5$ ESM mientras que en la región media fué del $13\% \pm 2.7$ ESM. Las diferencias en ambas regiones, no se pueden atribuir a un aumento en el número de células TRHérgicas de la zona parvocelular media, porque el promedio de células contadas/laminilla a lo largo del NPV, fué similar (figura 16); creemos que la diferencia en los porcentajes de localización se debe principalmente a un aumento en la concentración del RNAm de TRH en las células

de la región parvocelular media. Esto es evidente al observar que la densidad de la señal autoradiográfica del RNAm de TRH aumenta gradualmente de la región rostral a la caudal del NPV. Dado que el RNAm de TRH se encuentra más concentrado en la región parvocelular media, la posibilidad de detectar a una misma célula en dos cortes contiguos aumenta.

Los resultados de los cortes contiguos obtenidos manualmente, se verificaron con el programa por un conteo automático. Al comparar ambos resultados encontramos que en general se cuenta el mismo número de células pero sólo el 80% de las células contadas, coincide en ambos casos. Esto mostró que una fracción de las células se estaba detectando en forma aleatoria. Una posible explicación fué que los mapas trazados para cada uno de los cortes no son idénticos y ello repercute directamente en el empalme que se haga de los dos cortes.

Con el fin de validar si las detecciones encontradas en los cortes contiguos eran confiables, se realizó un experimento en el que se hibridó al RNAm de TRH y al RNAm de CRF en cortes contiguos del NPV; hasta ahora no se ha reportado que estos mensajeros coexistan en la misma célula. Los resultados de este experimento mostraron un porcentaje de coincidencia de alrededor del $2.7\% \pm 0.18$ ESM (n=13), al hacer el empalme de los cortes contiguos en todo el NPV (figura 19); el número de pares analizados es lo suficientemente grande (n=13) para confiar en este control. De esta forma, restamos los valores obtenidos en el ensayo con CRF a los resultados obtenidos en los ensayos de TRH con TRH, TRH con PC1 y TRH con PC2.

Los ensayos de detección de los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2 en las neuronas TRHérgicas del NPV mostraron que los mensajeros de las dos enzimas se sintetizan en las neuronas TRHérgicas del NPV, aunque en proporciones distintas. Para la PC1 encontramos que su RNAm se localiza en todas las células TRHérgicas de la región parvocelular anterior y en sólo el 50% de las TRHérgicas de la región parvocelular media. En cuanto a la PC2, sólo determinamos el porcentaje de células TRHérgicas que contiene a su RNAm en la región parvocelular media y este fué de 70%. Aunque la detección de dos mensajeros distintos en una misma célula fué ampliamente utilizada en años pasados en cortes de cerebro contiguos, su uso ha disminuído grandemente.

La detección de los RNAs mensajeros en cortes de cerebro contiguos deja abierta la posibilidad de que los eventos detectados sean producto del azar; por ello implementamos el ensayo de doble hibridación para detectar a los RNAs mensajeros de TRH y PC1 ó de TRH y PC2 en un mismo corte. El análisis de los resultados de doble hibridación por medio del sistema analizador de imágenes permitió confirmar, que en el NPV del hipotálamo, las neuronas TRHérgicas contienen a los RNAs mensajeros de PC1 ó de PC2. A diferencia de lo encontrado con la PC1 en la región parvocelular anterior, en el ensayo de los cortes contiguos, la doble hibridación mostró, que en esta región el RNAm de PC1 colocaliza con el RNAm de TRH en menos del 45% de las células TRHérgicas; dado que las células de la región parvocelular anterior, contienen menor cantidad de RNAm que las de la región media, es posible que el número de células positivas se haya sobrevalorado al hacer la cuantificación de los cortes en esta zona. El resultado obtenido con la PC1 en la región media fué comparable a lo obtenido en los cortes contiguos. Para la PC2, los resultados obtenidos con ambos ensayos fueron comparables. Esto permite validar el uso de ambas estrategias para la localización de RNAs mensajeros en una misma

célula. No podemos definir con certeza cual es el número real de eventos de colocalización, porque al realizar el ensayo de hibridación, con dos isótopos distintos (^{35}S y ^{33}P) encontramos que en uno de los ensayos, el ruido de fondo fué mayor (ensayo con ^{35}S); en este ensayo, el porcentaje de coincidencias también aumentó; sin embargo en ambos experimentos se mantuvo la relación encontrada para PC1 y PC2 en las neuronas TRHérgicas: la población de neuronas TRHérgicas que contiene a PC2 es mayor que la que contiene a PC1. Aunque para los ensayos se emplearon ratas del mismo sexo y de la misma edad, no descartamos que las diferencias encontradas entre los porcentajes de colocalización puedan deberse a cambios particulares entre cada animal.

Aunque los ensayos de doble hibridación dan mayor confiabilidad que los ensayos en cortes contiguos, sabemos que la detección del RNAm de TRH con el método colorido está disminuída, ya que el número de células detectadas con este transcrito, es significativamente menor al que se detecta con la radiactividad (figura 25). La detección inmunocitoquímica de las sondas marcadas con digoxigenina, acopladas a peroxidasa, ha sido mejorada incubando al sustrato de la enzima, en presencia de sulfato de níquel; es posible que el ensayo de hibridación con el transcrito de TRH dig mejore con el uso de esta sal. La sensibilidad del ensayo también pudiera incrementarse mediante el uso de un anticuerpo antidig fosfatasa alcalina que genera reacciones mas intensas en un lapso de tiempo menor al requerido para la reacción con la peroxidasa (aunque el ruido de fondo aparece con mayor rapidéz).

Los resultados obtenidos muestran, que no todas las neuronas TRHérgicas del NPV sintetizan a PC1 ó a PC2; si bien es posible que existan poblaciones distintas que sintetizan a PC1 y a PC2 (tabla 2), también cabe la posibilidad de que dentro de la población de TRHérgicas que sintetiza a PC2, exista una subpoblación de neuronas que esté sintetizando a ambas enzimas. Esta última posibilidad implicaría que el mecanismo de activación para algunas de las neuronas TRHérgicas del NPV fuera distinto. Recientemente se identificó al RNAm del BDNF en una población de neuronas TRHérgicas del NPV (95); la secuencia aminoácida de este factor trófico presenta sitios de procesamiento dibásico, que son susceptibles al corte por PC1 y por PC2 (96). Aunque esto no ha sido probado, es posible que en las neuronas TRHérgicas del NPV que contienen al BDNF los requerimientos para ambas enzimas sean distintos.

El procesamiento completo del precursor de TRH genera, además de las moléculas de TRH, a una serie de péptidos crípticos cuya función en la mayoría de los casos se desconoce. Uno de estos péptidos crípticos (PS4), se secreta junto con el TRH de la eminencia media a la sangre portal y posteriormente se une a su receptor en sitios específicos de la hipófisis desde donde potencia el efecto del TRH sobre la secreción de TSH (83). No se sabe si el procesamiento del precursor en esta condición, requiere de la acción concertada de PC1 y de PC2 en una misma célula ó en toda la población TRHérgica (si es que las células sintetizan sólo a una de las dos enzimas) ó si el procesamiento del precursor se encuentra aumentado sólo en una parte de la población. También se demostró recientemente, que el precursor de TRH (proTRH₁₇₈₋₁₉₉) codifica para un factor hipotalámico (CRIF), que tiene actividad inhibitoria sobre la síntesis y secreción de corticotropina (tanto basal como estrimulada por CRF) en células adenohipofisarias en cultivo (84); no sabemos que sucede *in vivo* cuando la demanda de este factor es mayor.

Dado que el procesamiento del precursor puede generar moléculas con distintas actividades biológicas, es necesario conocer los elementos celulares que participan en la activación de las formas biológicas del precursor.

En un estudio reciente se demostró que la expresión de PC1 y de PC2 en las neuronas TRHérgicas del SNC es diferencial (97). Las células TRHérgicas de las distintas regiones, sintetizan a PC1 y a PC2. Sin embargo, en algunas zonas como en el núcleo reticular talámico, ninguna de las dos enzimas se expresa y en el bulbo olfatorio sólo se expresa PC2. Esta pudiera ser una razón por la cual el procesamiento del precursor es diferencial a través del SNC. En este estudio mostramos, que la proporción de células TRHérgicas del NPV que sintetizan a PC1 ó a PC2, es menor a la proporción que se encuentra en las células TRHérgicas adyacentes al fórnix; de hecho los resultados muestran que en la región del fórnix, una gran parte de las células TRHérgicas (por lo menos el 67% de la población), podría estar sintetizando a ambas enzimas. No sabemos si los requerimientos de TRH en estas células son mayores ó si otras moléculas que requieren la actividad de estas enzimas también se están sintetizando.

En el NPV, cerca de la mitad de las neuronas TRHérgicas sintetizan a PC1 ó a PC2 pero no sabemos si están sintetizando a ambas. Aunque *in vitro* ambas enzimas son capaces de procesar al precursor hasta sus formas finales, desconocemos si en las neuronas TRHérgicas del NPV estas enzimas se utilizan de manera indistinta (p.e, que ambas procesen al proTRH hasta sus productos finales y se empaqueten indistintamente con él, en los gránulos secretorios), ó si existen requerimientos para que una lo procese primero (p.e, que la acción inicial de una de las convertasas sea necesaria para exponer sitios de procesamiento que son cortados por una segunda convertasa y que por lo tanto ambas se tengan que empaquetar con el precursor en el mismo gránulo). Para responder a estas preguntas será necesario determinar con certeza a las formas proteicas de PC1 y PC2 en los gránulos secretorios de las neuronas TRHérgicas.

La identificación de los sitios celulares en donde da inicio el procesamiento del precursor ya ha sido propuesta (98). En células AtT20 transfectadas con el cDNA de TRH, se ha demostrado (a partir de fracciones celulares y extracciones para detectar a los péptidos por radioinmunoensayo) que el precursor de TRH sufre un primer corte en la fracción del RER/Golgi que genera a los productos intermediarios de N-terminal; en la fracción correspondiente a los gránulos secretorios, se detectan tanto los productos intermediarios como los productos finales correspondientes a los péptidos crípticos y al TRH, pero no se detecta al precursor.

Ensayos de pulso y caza también han demostrado, que el procesamiento del precursor, inicia en la región RER/Golgi ya que en este compartimento se ha detectado al precursor completo y a las formas intermediarias del C-terminal. Será interesante confirmar si *in vivo*, estos compartimentos contienen a la forma proteica activa de PC1 y/ó la forma proteica de PC2, en las neuronas TRHérgicas del NPV.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo hemos demostrado que los RNAs mensajeros de PC1 y de PC2 se sintetizan en las neuronas TRHérgicas del NPV aunque en proporciones distintas. Dado que nuestros datos dejan abierta la posibilidad de que pudiera existir una población de neuronas TRHérgicas que sintetiza a ambas convertasas, la estrategia siguiente consistirá en demostrar si los RNAs mensajeros de TRH, PC1 y PC2, coexisten en una misma célula (ensayos de triple marcaje).

Si bien es cierto que *in vitro*, ambas enzimas son capaces de procesar al precursor de TRH hasta sus formas finales, aún queda por investigar, cuál es el papel que desempeña PC1 y PC2 en el procesamiento del precursor *in vivo*. Una manera de inferir si ambas convertasas intervienen o no en el procesamiento del proTRH, consistirá en determinar si la expresión de PC1 y/o de PC2, se regula en condiciones en las que se estima que el procesamiento y/o la liberación del péptido están cambiando. Bajo estas condiciones será necesario cuantificar por radioinmunoensayos, si existen cambios en la concentración de las formas proteicas activas de PC1 y de PC2.

Será interesante determinar si es que existe regulación de la expresión de las convertasas a la par con el procesamiento del precursor, y si la regulación se dá de manera general en las neuronas TRHérgicas del NPV ó si existen subpoblaciones de neuronas que responden sólo a determinados estímulos.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D., Eds. 1989. Macromolecules: Structure, shape and information. En: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. Pags. 639-680.
2. Kurjan, J., y Herskowitz, I. 1982. Structure for a yeast pheromone gene (MF α): a putative α -factor precursor contains four tandem repeats of mature α -factor. *Cell* 30: 933-943.
3. Cooke, N.E., Cot, D., Weiner, R.I., Baxter, J.D., y Martin, J.A. 1980. Structure of a cloned cDNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *J.Biol. Chem.* 255: 6502-6510.
4. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischler, E., Rutter, W.J., y Goodman, H.M. 1977. Rat insulin genes: constructions of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196:1313-1319.
5. Taussig, R., y Scheller, R.H. 1986. The aplysia FMRFamide gene encodes sequences related to mammalian brain peptides. *DNA* 5:453-461.
6. Lechan, R.M., Wu, P., Jackson, I.M.D., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G. y Goodman, R. 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor characterization in rat brain. *Science* 231: 159-161.
7. Nakanishi, S., Inoue, A., Kita, T., Nakamura, M., Chang, A.C., Cohen, S.N., y Numa, S. 1979. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin β -lipotropin precursor. *Nature* 278: 423-427.
8. Krieger, D.T., y Liotta, A.S. 1979. Pituitary hormones: what, where and why. *Science* 205: 366-372.
9. Scheller, R.H., Jackson, J.F., Mc Allister, L.B., Rothman, B.S., Mayeri, E., y Axel, R. 1983. A single gene encodes multiple neuropeptides mediating a stereotyped behavior. *Cell* 32: 7-22.
10. Ptashne, M. 1988. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature* 355: 683-689.
11. Lewin, B., Ed. 1990. Building the transcription complex. En: *Genes IV*. Oxford University Press and cell press. Pags. 543-577.
12. Proudfoot, N.J. 1989. How RNA polymerase II terminates transcription in higher eucaryotes. *TIBS* 14:105-110.
13. Krieger, D.T., Brownstein, M.J., y Martin, J.B. 1983. Biosynthesis and processing of neuropeptides. En: *Brain Peptides*. John Wiley and sons. Pags. 79-116.
14. Herman, R.C., 1989. Alternatives for the initiation of translation. *TIBS* 14: 219-222.
15. Jackson, R.J., y Standart, N. 1990. Do the polyA tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 62 :15-24.
16. Smith, C.W., Patton, J.G., y Nadal, G.B. 1989. Alternative splicing in the control of gene expression. *Ann. Rev. Gen.* 23: 527-577.
17. Iain, W., Matta, J., Tollervey, D., y Seraphin, B. 1993. Small nuclear RNAs in messenger RNA and ribosomal RNA processing. *FASEB Journal* 7:47-53.
18. Gierasch, L.M. 1989. Signal sequences. *Biochemistry* 28: 923-930.
19. Rapport, T.A. 1990. Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *TIBS* 15:355-358.

20. Darnell, J., Lodish, H., y Baltimore, D. 1990. *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. Pags. 639-680.
21. Gainer, H. 1982. Precursor processing and the neurosecretory vesicle. En: *Molecular Genetic Neuroscience*. Eds: Schmitt, F.D., Bird, S.J., y Bloom, F.E. Pags. 171-187.
22. Rothman, J.E., y Orci, L. 1990. Movement of proteins through the Golgi stack: A molecular dissection of vesicular transport. *FASEB J* 4: 1460-1468.
23. Scheller, R.H., et al. 1982. A family of genes that codes for ELH, a neuropeptide eliciting a stereotyped pattern of behavior in aplysia. *Cell* 28:707-719.
24. Jilius, D., Brake, A., Blair, L., Kunisawa, R., Thorner, J. 1984. Isolation of the putative structural gene for the lysine-arginine cleaving endopeptidase required for processing of yeast prepro α -factor. *Cell* 37:1075-1089.
25. Thim, L., Hansen, M.T., Norris, K., et al. 1986. Secretion and processing of insulin precursors in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6766-6770.
26. Bourbonnais, Y., Bolin, D., y Shields, D. 1988. Secretion of somatostatin by *S. Cerevisiae*: correct proteolytic processing of pro α -factor somatostatin hybrids requires the products of the KEX2 and ste (tre) genes. *J Biol Chem* 263 : 342-345.
27. Thomas, G., Thorne, B.A., Thomas, L., et al. 1988. Yeast Kex2 endopeptidase correctly cleaves a neuroendocrine prohormone in mammalian cels. *Science* 241: 226-230.
28. Foster, D.C., Holly, R.D., Sprecher, C.A., Walker, K.M., y Kumar, A.A. 1991. Endoproteolytic processing of the human protein C by the yeast Kex2 endopeptidase coexpressed in mammalian cels. *Biochemistry* 30: 367-372.
29. Fuller, R.S., Brake, A., y Thorner, J. 1989. Yeast prohormone processing enzyme (Kex2 gene product) is a Ca^{2+} dependent serine protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1434-1438.
30. Fuller, R.S., Brake, A.J., y Thorner, J. 1989. Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing protease. *Science* 246: 482-486.
31. Roebroek A.J.M., Schalken, J.A., Leunissen, J.A.M., Onnekink, C., Gloemers, H.P.J., y Van de Ven, W.J.M. 1986. Evolutionary conserved close linkage of c-fes/fps proto-oncogene and genetic sequences encoding a receptor like protein. *Embo J.* 5: 2197-2202.
32. Van de Ven, W.J.M., Voorberg, J., Fontijn, R., Pannekoek, H., Ouweland, A.M.W., Van Duijnhoven, H.L.P., Roebroek, A.J.M., y Siezen, R.J. 1990. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 14: 265-275.
33. Seidah, N.G., Gaspar, L., Mion, P., Marcinkiewicz, M., Mbikay, M., y Chrétien, M. 1990. cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: tissue-specific mRNAs encoding candidates for prohormone processing proteinases. *DNA Cell Biol* 9: 415-424.
34. Smeekens, S.P., Auruch, A.S., La Mendola, J., Chan, S.J., y Steiner, D.F. 1991. Identification of a cDNA encoding a second putative prohormone convertase related to PC2 in AtT20 cells and islets of Langerhans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 340-344.
35. Smeekens, S.P., y Steiner, D.F. 1990. Identification of a human insulinoma cDNA encoding a novel mammalian protein structurally related to the yeast dibasic processing protease Kex2. *J. B. C.* 265: 2997-3000.

36. Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikumizu, J., Baba, T., y Murakami, K. 1992. Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. *J. B. C.* 267: 5897-5900.
37. Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., y Chrétien, M. 1992. Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like pro-protein convertase. *Mol. Endoc.* 6: 1559-1569.
38. Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Jonh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D., y Barr, P.J. 1991. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the *fes/fps* region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* 10: 757-769.
39. Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M., y Seidah, N.G. 1993. cDNA structure of the mouse and rat subtilisin /Kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and noendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6691-6695.
40. Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K., y Nakayama, K. 1993. Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J. Bioch.* 113: 132-135.
41. Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chrétien, M., y Seidah, N.G. 1993. Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphatation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Bioch. J.* 294: 735-743.
42. Vindrola, O. 1994. Rapid cleavage of the endogenous PC3 prosegment and slow conversion to 74 KDa and 66 KDa proteins in AtT-20 cells. *Neuropeptides* 27: 109-120.
43. Wilcox, C.A., y Fuller, R. 1991. Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *saccharomyces cervisiae* secretory pathway. *Journal Cell Biol.* 115: 297-307.
44. Leduc, R., Molloy, S.S., Thomas, B.A., y Thomas, G. 1992. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. B. C.* 267 (20) : 14304-14308.
45. Jean, F., Basak, A., Rondeau, N., Benjannet, S., Hendy, G.N., Seidah, N.G., Chrétien, M., y Lazure, C. 1993. Enzymic characterization of murine and human prohormone convertase 1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem. J.* 292 (3) : 891-900.
46. Matthews, G., Shennan, K.I.J., Seal, A.J., Taylor, N.A., Colman, A., y Docherty, K. 1994. Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *J. B. C.* 269 (1) : 588-592.
47. Martens, G.J.M., Braks, J.A.M., Eib, D.W., Zhou, Y., y Lindberg, I. 1994. The neuroendocrine polypeptide 7B2 is an endogenous inhibitor of prohormone convertase PC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5784-5787.
48. Braks, J.A.M., y Martens, G.J.M. 1994. 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* 78: 263-273.
49. Schafer, M.K.H., Day, R., Cullinan, W.E., Chrétien, M., Seidah, N.G., y Watson, S.J. 1993. Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: A comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosc.* 13 : 1258-1279.

36. Nakayama, K., Kim, W.S., Torii, S., Hosaka, M., Nakagawa, T., Ikumizu, J., Baba, T., y Murakami, K. 1992. Identification of the fourth member of the mammalian endoprotease family homologous to the yeast Kex2 protease. *J. B. C.* 267: 5897-5900.
37. Seidah, N.G., Day, R., Hamelin, J., Gaspar, A., Collard, M.W., y Chrétien, M. 1992. Testicular expression of PC4 in the rat: molecular diversity of a novel germ cell-specific Kex2/subtilisin-like pro-protein convertase. *Mol. Endoc.* 6: 1559-1569.
38. Kiefer, M.C., Tucker, J.E., Jonh, R., Landsberg, K.E., Saltman, D., y Barr, P.J. 1991. Identification of a second human subtilisin-like protease gene in the *fes/fps* region of chromosome 15. *DNA Cell Biol.* 10: 757-769.
39. Lusson, J., Vieau, D., Hamelin, J., Day, R., Chrétien, M., y Seidah, N.G. 1993. cDNA structure of the mouse and rat subtilisin /Kexin-like PC5: a candidate proprotein convertase expressed in endocrine and noendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6691-6695.
40. Nakagawa, T., Hosaka, M., Torii, S., Watanabe, T., Murakami, K., y Nakayama, K. 1993. Identification and functional expression of a new member of the mammalian Kex2-like processing endoprotease family: its striking structural similarity to PACE4. *J. Bioch.* 113: 132-135.
41. Benjannet, S., Rondeau, N., Paquet, L., Boudreault, A., Lazure, C., Chrétien, M., y Seidah, N.G. 1993. Comparative biosynthesis, covalent post-translational modifications and efficiency of prosegment cleavage of the prohormone convertases PC1 and PC2: glycosylation, sulphatation and identification of the intracellular site of prosegment cleavage of PC1 and PC2. *Bioch. J.* 294: 735-743.
42. Vindrola, O. 1994. Rapid cleavage of the endogenous PC3 prosegment and slow conversion to 74 KDa and 66 KDa proteins in AtT-20 cells. *Neuropeptides* 27: 109-120.
43. Wilcox, C.A., y Fuller, R. 1991. Posttranslational processing of the prohormone-cleaving Kex2 protease in the *saccharomyces cervisiae* secretory pathway. *Journal Cell Biol.* 115: 297-307.
44. Leduc, R., Molloy, S.S., Thomas, B.A., y Thomas, G. 1992. Activation of human furin precursor processing endoprotease occurs by an intramolecular autoproteolytic cleavage. *J. B. C.* 267 (20) : 14304-14308.
45. Jean, F., Basak, A., Rondeau, N., Benjannet, S., Hendy, G.N., Seidah, N.G., Chrétien, M., y Lazure, C. 1993. Enzymic characterization of murine and human prohormone convertase 1 (mPC1 and hPC1) expressed in mammalian GH4C1 cells. *Biochem. J.* 292 (3) : 891-900.
46. Matthews, G., Shennan, K.I.J., Seal, A.J., Taylor, N.A., Colman, A., y Docherty, K. 1994. Autocatalytic maturation of the prohormone convertase PC2. *J. B. C.* 269 (1) : 588-592.
47. Martens, G.J.M., Braks, J.A.M., Eib, D.W., Zhou, Y., y Lindberg, I. 1994. The neuroendocrine polypeptide 7B2 is an endogenous inhibitor of prohormone convertase PC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 5784-5787.
48. Braks, J.A.M., y Martens, G.J.M. 1994. 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway. *Cell* 78: 263-273.
49. Schafer, M.K.H., Day, R., Cullinan, W.E., Chrétien, M., Seidah, N.G., y Watson, S.J. 1993. Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: A comparative in situ hybridization analysis. *J. Neurosc.* 13 : 1258-1279.

50. Dong, W., Marcinkiewicz, M., Vieau, D., Chrétien, M., Seidah, N.G., y Day, R. 1995. Distinct mRNA expression of the highly homologous convertases PC5 and PACE4 in the rat brain and pituitary. *J. Neurosc.* 15:1778-1796.
51. Bresnahan, P.A., Leduc, R., y Thomas, L., et al. 1990. Human fur gene encodes a yeast Kex2-like endoprotease that cleaves pro β -NGF in vivo. *J. Cell Biol.* 111: 2851-2859.
52. Van de Ven, W.J.M., Voorberg, J., y Fontijn, R., et al. 1990. Furin is a subtilisin-like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol. Biol. Rep.* 14: 265-275.
53. Wise, R.J., Barr, P.J., Wong, P.A., Kiefer, M.C., Brake, A.J., y Kaufman, R.J. 1990. Expression of a human proprotein processing enzyme: correct cleavage of the Von Willebrand factor precursor at paired basic aminoacid site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 9378-9382.
54. Benjannet, S., Rondeau, N., Day, R., Chrétien, M., y Seidah, N.G. 1991. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving POMC at distinct pairs of basic residues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3564-3568.
55. Galanopoulou, A., y Patel, Y.C. 1993. Direct role of furin in mediating endoproteolytic cleavage of prosomatostatin (PSS) in cos-7 cells. Resúmen 441.3 Society of Neuroscience.
56. Galanopoulou, A.S., Kent, G., Zingg, H.H., y Patel, Y.C. 1992. Role of the mammalian endoproteases PC1 and PC2 in prosomatostatin (PSS) processing. Resúmen 122. Society of Neuroscience.
57. Sawyer, N., Rondeau, N., Chrétien, M., y Seidah, N.G. 1991. Expression and sorting of rat plasma kallikrein in POMC producing AtT-20 cells. *DNA Cell Biology* 10: 259-269.
58. Devi, L. 1991. Consensus sequence for processing of peptide precursors at monobasic sites. *FEBS Lett.* 280:189-194.
59. Bloomquist, B.T., Eipper, B.A., y Mains, R.E. 1991. Prohormone converting enzymes: regulation and evaluation of function using antisense RNA. *Mol. Endoc.* 5: 2014-2024.
60. Ouafik, L.H., May, V., Saffen, D.W., y Eipper, B.A. 1990. Thyroid hormone regulation of peptidylglycine α -amidating monooxygenase expression in anterior pituitary gland. *Mol. Endoc.* 4:1497-1505.
61. Birch, N.P., Hakest, D.J., Dixon, J.E., y Mezey, E. 1994. Distribution and regulation of the candidate prohormone processing enzymes SPC2 and SPC3 in adult rat brain. *Neuropeptides* 27: 307-322.
62. Marcinkiewicz, M., Nagao, T., Avoli, M., Day, R., Seidah, N.G., y Chrétien, M. 1994. Implication of prohormone convertases PC1, furin and PC5 in the processing of NGF and BDNF precursors in rats with pilocarpine seizures. Resúmen 610.4. Society of Neuroscience.
63. Bhat, R.V., Tausk, F.A., Baraban, J.M., Mains, R.E., y Eipper, B.A. 1993. Rapid increases in peptide processing enzyme expression in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 61(4): 1315-1322.
64. Birch, N.P., Rodríguez, C., Dixon, J.E., y Mezey, E. 1990. Distribution of carboxypeptidase H messenger RNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry: implications for neuropeptide biosynthesis. *Mol. Brain Res.* 7:53-59.

65. Fricker, L.D., Adelma, J.P., Douglass, J., Thompson, R.C., Strandmann, R.P.V., y Hutton, J. 1989. Isolation and sequence analysis of cDNA for rat carboxypeptidase E [EC 3.4.17.10], a neuropeptide processing enzyme. *Mol. Endoc.* 4 : 666-673.
66. Fisher, W.H., y Spiess, J. 1987. Identification of a mammalian glutaminyl cyclase converting glutaminyl into pyroglutamyl peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3628-3632.
67. Ouafik, L.H., Stoffers, D.A., Campbell, T.A., Johnson, R.C., Bloomquist, B.T., Mains, R.E., y Eipper, B.A. 1992. The multifunctional peptidylglycine α -amidating monooxygenase gene: Exon/intron organization of catalytic, processing, and routing domains. *Mol. Endocr.* 6 (10):1571-1584.
68. Brass, K.M., Harakall, S.A., Ouafik, L.H., Eipper, B.A., y May, V. 1992. Expression of peptidylglycine α -amidating monooxygenase: An in situ hybridization and immunocytochemical study. *Endocrinology* 130(5): 2778-2788.
69. Lee, S.L., Stewart, K., y Goodman, R.H. 1988. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J. B. C.* 263: 16604-16609.
70. Griffiths, E.C., y Bennett, J.R. Eds. 1983. *Thyrotropin-Releasing Hormone*. Raven press, N.Y.
71. Hokfelt, T., Johansson, O., Ljungdahl, A., Lundberg, A., y Schultzberg, M. 1980. Peptidergic neurones. *Nature* 284: 515-521.
72. Spindel, E.R., Pettibon, D.J., y Wurtman, R.J. 1981. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) content of rat striatum: modification by drugs and lesions. *Brain Res.* 216: 323-331.
73. Nemeroff, C.B., et al. 1984. Elevated concentrations of CSF corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in depressed patients. *Science* 226: 1342-1344.
74. Kubek, M.J., et al. 1993. Thyrotropin-releasing hormone gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Annals of Neurology* 33:70-76.
75. Albert, M., Jenike, M., Nixon, R., y Nobel, K. 1993. Thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in patients with dementia of the Alzheimer type. *Biology of Psychiatry* 33: 267-271.
76. Lafer, B., Fava, M., Hammerness, P., y Rosenbaum, J.F. 1993. The influence of DST and TRH test administration on depression assessments: a controlled study. *Biological of Psychiatry* 34: 650-653.
77. Faden, A.I., y Salzman, S. 1992. Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends in Pharmacology Science* 13: 29-35.
78. Takeuchi, Y., et al. 1994. Efficacy of thyrotropin-releasing hormone in the treatment of spinal muscular dystrophy. *Journal Child Neurology* 9: 287-289.
79. Griffiths, E.C. 1985. Thyrotropin-releasing hormone: endocrine and central effects. *Psychoneuroendocrinology* 10: 225-235.
80. Leong, D.A., Frawley, L.S., Neill, J.D. 1983. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annual Review of Physiology* 45: 109-127.
81. De Greef, W.J., y Visser, T.J. 1981. Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *Journal of Endocrinology* 91: 213-233.
82. Lechan, R.M., y Segerson, T.P. 1989. Pro-TRH gene expression and precursor peptides in rat brain: observations by hybridization analysis and immunocytochemistry. *Annals N.Y. Academ of Science* 553: 29-33.

83. Carr, F.E., Reid, A.H., y Wessendorf, M.W. 1993. A cryptic peptide from the preprothyrotropin-releasing hormone precursor stimulates thyrotropin gene expression. *Endocrinology* 133 (2): 809-814.
84. Redei, E., Hilderbrand, H., y Aird, F. 1995. Corticotropin release-inhibiting factor is preprothyrotropin-releasing hormone- (178-199). *Endocrinology* 136: 3557-3563.
85. Covarrubias, L., Uribe, R.M., Méndez, M., Charli, J.L., y Joseph-Bravo, P. 1988. Neuronal TRH synthesis: Developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151: 615-622.
86. Uribe, R.M., Redondo, J.L., Charli, J.L., y Joseph-Bravo, P. 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58: 140-145.
87. Uribe, R.M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Méndez, M., Covarrubias, L., y Charli, J.L. 1991. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 54: 493-498.
88. Chan-Palay, V., y Palay, S.L. Eds. 1984. Coexistence of neuroactive substances in neurons. John Wiley and Sons, Inc.
89. Koibuchi, N., Gibbs, R.B., Suzuki, M., y Pfaff, D.W. 1991. Thyroidectomy induces fos-like immunoreactivity within thyrotropin-releasing hormone expressing neurons located in the paraventricular nucleus of the adult rat hypothalamus. *Endocrinology* 129 : 3208-3216.
90. Hakes, D.J., Birch, N.P., Mezey, A., y Dixon, J.E. 1991. Isolation of two complementary deoxyribonucleic acid clones from a rat insulinoma cell line based on similarities to Kex2 and furin sequences and the specific localization of each transcript to endocrine and neuroendocrine tissues in rats. *Endocrinology* 129: 3053-3063.
91. Zoeller, R.T., y Rudeen, P.K. 1992. Ethanol blocks the cold-induced increase in thyrotropin-releasing hormone mRNA in paraventricular nuclei but not the cold-induced increase in thyrotropin. *Molecular brain research* 13: 321- 330.
92. Chun, J.Y., Korner, J., Kreiner, T., Scheller, R.H., y Axel, R. 1994. The function and differential sorting of a family of alypsia prohormone processing enzymes. *Neuron* 12: 831-844.
93. Nillni, E.A., Friedman, T.C., Todd, R.B., Birch, N.P., Loh, Y.P., y Jackson, I.M.D. 1995. Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *Journal of neurochemistry* 65: 2462-2472.
94. Friedman, T.C., Loh, Y.P., Cawley, N.X., Birch, N.P., Huang, S.S., Jackson, I.M.D., y Nillni, E.A. 1995. Processing of prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes. *Endocrinology* 136: 4462-4472.
95. Smith, M.A., Makino, S., Kim, S.Y., y Kvetnansky, R. 1995. Stress increases brain-derived neurotropic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 136 : 3743-3750.
96. Maisonpierre, P.C., Le Beau, M.M., Espinosa, R., Ip, N.Y., Belluscio, L., de la Monte, S.M., Squinto, S., Furth, M.E., y Yancopoulos, G.D. 1991. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin- 3: gene structures, distributions, and chromosomal localizations. *Genomics* 10: 558- 568.

97. Pu, L.P., Ma, W., Barker, J.L., y Loh, Y.P. 1996. Differential coexpression of genes encoding prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) and prohormone convertases (PC1 and PC2) in rat brain neurons: Implications for differential processing of pro-TRH. *Endocrinology* 137 : 1233-1241.
98. Nillni, E.A., Sevarino, K.A., y Jackson, I.M.D. 1993. Processing of proTRH to its intermediate products occurs before the packing into secretory granules of transfected AtT20 cells. *Endocrinology* 132 : 1271-1277.

Anexo 1

Determinación del porcentaje de incorporación del nucleótido radiactivo en el DNA. De la mezcla de reacción, se toman 0.5 µl y se diluyen en 25 µl de una solución que contiene EDTA 10mM, SDS 0.1% y 0.5 mg/ml de tRNA. De esta mezcla se toman 5 µl y se colocan por cuatuplicado en papeles DEAE-81 de 1 cm². Los papeles se secan en la estufa por 5 min y dos de estos sirven como control de las cpm totales; los dos restantes se lavan 5 veces durante 5 min cada vez (con el fin de eliminar del papel la marca no incorporada) en solución de fosfato de sodio dibásico 0.5 M, se enjuagan 1 min en agua y 1 min en etanol absoluto. Posteriormente los cuatro papeles se colocan individualmente en viales con 5 ml de líquido de centelleo (0.8 % PPO grado centelleo y 0.01% POPOP en tolueno) y se determinan las cpm's en un contador de emisiones β.

El porcentaje de incorporación se define por el número de cuentas que quedan en los papeles lavados entre el número de cuentas de los papeles sin lavar, todo esto multiplicado por cien. La actividad específica de los oligos marcados se determina con la relación de cpm's incorporadas / µg de DNA inicial.

Anexo 2

Detección de la incorporación del UTP-Dig al transcrito por "Northern" empleando fosfatasa alcalina

Previo a los ensayos de hibridación *in situ*, se analiza por electroforesis una muestra del transcrito en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes (2.2 M de formaldehído, 10 mM de fosfato de sodio pH 7.0); a la par se pone en el gel un marcador de peso molecular y un RNA estándar sintetizado con UTP Dig. Las muestras se preparan con 1 volumen igual de "stop mix de secuencia", formaldehído 2.2 M, buffer de fosfatos 10 mM, 1.2 µg de bromuro de etidio y agua para un volumen final de 15 µl; las alícuotas se desnaturalizan por 5 min a 65 °C. El buffer de corrida es fosfato de sodio 10 mM pH 7.0 y el gel se corre a 50 volts durante 40 min. Posterior a la electroforesis, el gel se observa con luz U.V, se toma una fotografía del mismo y posteriormente se hace una transferencia tipo "Northern" a una membrana de nylon. Pasado ese tiempo, se checa el gel con luz U.V para asegurarse que la transferencia haya sido completa y las muestras de la membrana se fijan con U.V (Stratalinker, a 1200 Joules durante 5 min).

Para detectar el color en las muestras de RNA se hace lo siguiente:

La membrana se humedece en buffer B (Tris HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) durante 5 min con agitación a T.A.

- En este momento se prepara una solución de Buffer B, que en 5 ml contiene:

22.5 µl de cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT) 75 mg/ml y

17.5 µl de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato, 4-toluidina (X-fosfato) 50 mg/ml.

Dado que ambos reactivos son sensibles a la luz, el tubo con la solución se protege con papel aluminio.

Se incuba la membrana con reactivo para bloquear al 5 % (Cat. No. 1096176 de Boehringer) disuelto en PBS 1x, pH 7.5 durante 5 min. (El reactivo para bloquear se prepara varias horas antes de su uso; si se forma un precipitado, se adiciona una gota de NaOH 5N y se checa que el pH se mantenga en 7.5)

Se retira el reactivo para bloquear y se adiciona el reactivo de color que contiene

NBT y X-fosfato cubriendo la caja para que no le dé la luz a la membrana. Se espera entre 5 y 10 min para que aparezca el color, y posteriormente se retira la solución y la reacción se para incubando nuevamente con buffer B.

Cuantificación del transcrito de Dig

Para cuantificar los transcritos de TRH Dig, se hace lo siguiente:

Se sintetiza un transcrito en frío (que no contenga UTP Dig) y posteriormente, se colocan cantidades conocidas de éste con 1 volumen igual de "stop mix de secuencia" en un gel de agarosa al 1%, 10 mM de fosfato de sodio pH 7.0, junto con las alcuotas de los transcritos de TRH Dig. El gel se corre a 180 volts por un tiempo de 5 min y posteriormente se tiñe durante 3 min con bromuro de etidio; se lava en agua por un tiempo aproximado de 20 min. Se toma una fotografía del gel en negativo y se cuantifica por densitometría de la señal. La densidad óptica de los transcritos de TRH Dig, se compara con la de la curva estándar del transcrito en frío. La eficiencia de transcripción en frío reportada con el kit de Boehringer es de 10 µg / 25 µl de templado.

Anexo 3

Análisis de las hibridaciones *in situ* a nivel microscópico

a) Emulsión de los tejidos

Material:

1 frasco de emulsión fotográfica LM-1 para microscopía de luz, de 20 ml (emulsión de Amersham para microautoradiografía de alta resolución, código RPN 40). * La emulsión es sensible a todas las partículas cargadas y por lo tanto puede ser utilizada con todos los isótopos que se emplearon.

Laminillas limpias por ambos lados (se limpian con H₂O y con servitoallas que no dejen pelusas sobre los porta)

1 baño de agua a 45 °C

1 vaso pequeño de 50 ml limpio, una paleta de vidrio, una vasija de Unicel para colocar el frasco con la emulsión, un nivel metálico apoyado sobre papel Parafilm para dejar secando las laminillas en forma vertical, una caja de plástico (negra), una bolsa negra, sílica gel activada como desecador, algunos portaobjetos para probar la emulsión, un termómetro, una cuchara ó espátula plástica, un "timer" y una o varias gasas humedecidas en agua, para limpiar la emulsión del lado del portaobjetos que no contiene al tejido.

Procedimiento:

Se estabiliza el baño de incubación a 45 °C (nunca arriba de 50 °C) por lo menos una hora antes de utilizarlo.

Se colocan todos los utensilios de manera accesible

Se coloca el vaso para la emulsión en el baño con el fin de equilibrar su temperatura

Se apaga la luz del cuarto unos 10 minutos antes de comenzar , con el fin de detectar si hay filtros de luz en el cuarto, que pudieran velar la emulsión.

Se enciende la lámpara de seguridad (filtro rojo de Kodak GBX-2, Cat. 1416627) y se coloca el frasco de emulsión en el baño por 10 min para que se funda, moviendo varias veces con la espátula.

Se vierte la emulsión en el vaso que previamente se colocó dentro del baño y posteriormente se quitan las burbujas de la superficie deslizando un portaobjetos sobre ésta.

Se expone el portaobjetos a la luz de seguridad para detectar su aún existen burbujas en la emulsión.

Se repite varias veces esta operación hasta que el portaobjetos no presente burbujas; cuando está lista la emulsión, se apaga la luz de seguridad y se sumergen las laminillas del ensayo, una a una, verticalmente y hasta el fondo del vaso durante 5 segs.

Con la gasa humedecida, se limpia el lado del portaobjetos que no tiene tejido y se apoya la laminilla en el nivel metálico, en posición vertical.

Al terminar la inmersión en la emulsión, de todas las muestras, se regresa ésta al frasco original, se protege de la luz y se guarda nuevamente a 4 °C para reusarla (opcional).

Se dejan secando las laminillas a T.A aproximadamente 3 hrs. * es mejor que estén en un ambiente ventilado.

Posteriormente se colocan en una caja negra y se sella la caja con cinta para evitar posibles filtraciones de luz.

Se guarda la caja en la bolsa negra que contiene la sílica gel y se almacena a 4°C para su exposición (es importante guardar la bolsa en un refrigerador que no tenga material radiactivo).

b) Revelado de la emulsión

Reactivos:

Revelador D-19 de Kodak (Cat.1946045)

Solución de ácido acético al 0.5% en agua desionizada

Fijador GBX de Kodak (Cat.1902485)

*Todos estos reactivos deberán estar a una temperatura de 15 °C (máximo 20) ya que esta temperatura tiene poco efecto sobre la emulsión. Es importante que la temperatura entre los reactivos sea la misma o que no varíe más de 2 °C entre reactivo y reactivo.

Procedimiento:

Para llevar a cabo el revelado de la emulsión, las laminillas que están a 4 °C se equilibran a la temperatura del ambiente entre 2 y 3 hrs (dependiendo del No. de laminillas que se tengan).

Se apaga la luz del cuarto oscuro unos 10 min antes de proceder al revelado con el fin de detectar filtros posibles de luz que pudieran velar la emulsión. Se enciende la luz roja de seguridad y se preparan los utensilios para el revelado con los reactivos en el orden acostumbrado. Se checa la temperatura de estos (15 °C) y posteriormente se acomodan las laminillas en la (s) canastilla (s) para revelarlas de la manera siguiente:

2 minutos en el revelador con agitación gentil

1 minuto en la sol. de Ac. acético 0.5% con agitación gentil

2 minutos en el fijador con agitación gentil

Se enciende la luz de seguridad y se deja 4 min más en el fijador

Se enciende la luz del cuarto y se deja 4 min más en el fijador
Se lavan las laminillas en agua con agitación gentil a 15 °C por 15 min (asegurándose que la temperatura del agua no varíe más de 2 grados con la temperatura de los reactivos)
Se dan 2 lavados más de 15 min c/u
Se cambia el agua y se comienzan a sacar una a una las laminillas para limpiar con una gasa humedecida, el lado del portaobjetos que no contiene tejido.
Se colocan las laminillas de manera vertical en un portalaminillas por un mínimo de 30 min y posteriormente se observan al microscopio.

Anexo 4

Tinción de los tejidos

Para evitar diferencias de contraste entre las laminillas de un mismo ensayo, es preferible preparar un tren de tinción en donde todas las laminillas se someten al mismo tiempo al tratamiento de tinción.

Tinción con violeta de cresilo

Se colocan todas las laminillas en un recipiente que contenga violeta de cresilo (cat. No. C0775 de Sigma) al 1% durante 1 min

Se quita el exceso decolorante con etanol al 96%

Se deshidrata el tejido por 40 segs en etanol absoluto

Se dan 3 pasos rápidos en xilol

Se coloca una gota de resina para montar (Baxter, cat. M7630-2) y posteriormente el cubreobjetos sin dejar burbujas de aire sobre el tejido.

El secado de las laminillas se hace en forma horizontal a T.A.

*sólo si el colorante muestra algún precipitado, se debe de filtrar antes de ser utilizado.

Tinción con hematoxilina-eosina

Se hidratan los tejidos en alcohol etílico al 96% por 1 min

Se dá un paso por H₂O de 1 min

Se introducen las laminillas en hematoxilina (cat. No.H9627 de Sigma) por 5 min

Se enjuagan en agua hasta quitar el exceso del colorante

Se hacen 2 pasos rápidos en alcohol etílico al 96% con ácido clorhídrico (1 ml por cada 100 ml de alcohol)

Se enjuagan 1 min en H₂O

Se hacen 3 pasos rápidos en eosina (cat. No.45380 de Sigma)

Se enjuagan en agua hasta quitar el exceso de colorante

Se introducen en alcohol etílico al 96% por 1 min

Se introducen en alcohol etílico absoluto por 1 min

Se dan 3 pasos rápidos en xilol

Se dan otros 3 pasos rápidos en xilol

Se monta el cubreobjetos con una gota de resina de tal forma que no queden burbujas de aire sobre el tejido.

El secado de las laminillas se hace a T.A. en forma horizontal.

*Es necesario filtrar los colorantes antes de utilizarlos porque forman precipitados.