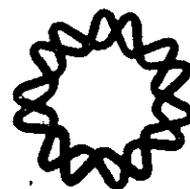


00551



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



***INTERACCION DE ACTIVADORES DE PROTEINAS CINASAS A Y C, GLUCOCORTICOIDES Y
HORMONAS TIROIDEAS EN LA REGULACION DE LA BIOSINTESIS RAPIDA DE LA HORMONA
LIBERADORA DE TIROTROPINA EN CULTIVOS PRIMARIOS DE CELULAS HIPOTALAMICAS
FETALES DE RATA.***

TESIS

**Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Bioquímicas
presenta el Médico Cirujano
Alfonso Carreón Rodríguez**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo
COTUTORA: Dra. Leonor Pérez Martínez**

COMITE TUTORAL

**Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo
Dr. Jaime Mora Celis
Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay**

Cuernavaca, Morelos.

2000



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.

JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE: Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

SECRETARIO: Dr. Carlos Federico Arias Ortíz

VOCAL: Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

SUPLENTE: Dra. Claudia Treviño Santa Cruz

SUPLENTE: Dr. Jesús Santaolalla Tapia

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Neuroendocrinología del Departamento de Genética y Fisiología Molecular, bajo la dirección de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo y la cotutoría de la Dra. Leonor Pérez Martínez y se financió parcialmente con los donativos CONACYT-25385N y DGAPA-IN217797.

AGRADECIMIENTOS

A los Dres. Patricia Joseph Bravo y Jean Louis Charli Casalonga por la generosidad de permitirme ser parte de su equipo de investigación y por su invaluable dirección.

A la Dra. Leonor Pérez Martínez por su calidad humana, así como por su interés y paciencia en mi formación profesional.

A los miembros de mi comité tutorial, Dra. Yvonne Jane Rosenstein Azoulay y Dr. Jaime Mora Celis por donarme parte de su valioso tiempo con sus inapreciables observaciones.

A la Lic. Ma. Elena González Alzati, la Quím. Fidelia Romero , la MVZ Elizabeth Mata, la MVZ Graciela Cabeza, el Q.F.B. Miguel Cisneros, el Sr. Sergio González, el Sr. Manuel Villa y la Sra. Elena Martel por su apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio por sus enseñanzas diarias.

INDICE

ABREVIATURAS	8
RESUMEN	10
I. INTRODUCCION	11
A. Generalidades	11
B. Biosíntesis de la TRH	14
C. Regulación neural de la biosíntesis hipotalámica de la TRH	15
D. Regulación endocrina de la biosíntesis hipotalámica de la TRH	18
E. Estudios in vitro	20
II. ANTECEDENTES	22
III. HIPOTESIS	25
IV. OBJETIVOS	25
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
VI. MATERIALES Y METODOS	27
A. Cultivo primario de células dispersas de hipotálamo fetal de rata	27
B. Extracción de la TRH	30
C. Radioinmunoensayo de la TRH (RIA)	31
D. Determinación de proteínas	35
E. Extracción de RNA total	35
F. Transcripción reversa	36
G. Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)	37
H. Electroforesis de productos de PCR	37
I. Análisis estadístico	37
VII. RESULTADOS	38
A. Efecto de diversos tratamientos sobre la síntesis de la TRH in vitro	38
B. Efecto de hormona tiroidea sobre el mRNA de TRH in vitro	45
VIII. DISCUSION	50
IX. CONCLUSIONES	62
X. PERSPECTIVAS	63
XI. BIBLIOGRAFIA	64
XII. APENDICE	72

ABREVIATURAS

AMPc: Adenosín-monofosfato cíclico.

AP-1: Activator protein 1; proteína activadora 1.

B: Corticosterona; compuesto B de Kendall.

8Br-AMPc: 8 Bromo adenosín-monofosfato cíclico.

BSA: Bovine serum albumina; albúmina sérica bovina.

cDNA: Complementary desoxirribonucleic acid; ácido desoxirribonucleico complementario.

CHX: Cicloheximida.

CRE: cAMP Response Element; elemento de respuesta al AMPc.

CREB: cAMP Response Element Binding protein; proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.

CRH: Corticotropin releasing hormone; hormona liberadora de corticotropina.

DEX: Dexametasona.

DAG: Diacilglicerol.

db-AMPc: Dibutiril adenosín-monofosfato cíclico.

DβH: Dopamina β hidroxilasa.

DIV: Días *in vitro*.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium; medio de Eagle modificado de Dulbecco.

DMEM-I: DMEM incompleto.

DMEM-S: DMEM suplementado.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FBS: Fetal bovine serum; suero bovino fetal.

GH: Growth hormone; hormona del crecimiento.

G3PDH: Gliceraldehyde 3-phosphate deshidrogenase; Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.

HHT: Hipotálamo-hipófisis-tiroides.

NPY: Neuropeptido Y.

PAM: Peptidyl α-amidating monooxygenase; monooxigenasa alfa-amidante de peptidilglicina.

PBS: Phosphate buffered saline; amortiguador salino de fosfatos.

PCR: Polimerase chain reaction; reacción de la polimerasa en cadena.

PKA: Protein kinase A; proteína cinasa A.

PKC: Protein kinase C; proteína cinasa C.

PMA: phorbol 12-miristate 13-acetate; acetato de forbol miristato.

POA-AH: Preoptic area-anterior hypothalamus; hipotálamo anterior-area preóptica.

POMC: Proopiomelanocortina.

PP-II: Piroglutamil peptidasa II.

mRNA: messenger Ribonucleic acid; Acido ribonucleico mensajero.

NA: Noradrenalina.

NPV: Núcleo paraventricular.

NSE: Neuronal specific enolase; enolasa específica de neurona.

RIA: Radioimmunoassay; radioinmunoensayo.

RT: Reverse transcriptase; transcriptasa reversa.

S.E.M: Standard error of media; error estandar del promedio.

SRIF: Somatotropin releasing inhibiting factor; Factor inhibidor de la liberación de somatotropina.

T₃: Triiodotironina.

T₄: Tetraiodotironina o tiroxina.

TFA: Trifluoroacetic acid; ácido trifluoroacético.

THRE: Thyroid hormone response element; elemento de respuesta a hormonas tiroideas.

TPA: 12-O-tetradecanoyl-phorbol-ester.

TR: Thyroid receptor; receptor de hormonas tiroideas.

TRE: TPA response element; elemento de respuesta a TPA.

TRH: Thyrotropin releasing hormone; hormona liberadora de tirotropina.

TSH: Thyrotropin, o Thyroid Stimulating Hormone; hormona estimulante de la tiroides.

U.A: Unidades arbitrarias.

RESUMEN

La hormona liberadora de tiotropina (TRH) sintetizada y liberada por células del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo tiene una función de neurohormona al estimular la síntesis y liberación de hormona estimulante de la tiroides (TSH) en la adenohipófisis. La TSH estimula la síntesis y liberación de hormonas tiroideas las cuales a su vez afectan negativamente la expresión de la TRH y TSH. Esta cadena de eventos se conoce como eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT) y hay evidencias de que su actividad es regulada por neurotransmisores liberados por aferencias que hacen sinapsis con las células TRHérgicas del NPV, o por hormonas glucocorticoideas que llegan a dichas células por medio de la circulación sanguínea.

Aunque se ha estudiado el comportamiento del eje HHT frente a estímulos subagudos o crónicos tanto *in vivo* como *in vitro*, aun se desconocen los mecanismos de acción de los efectores involucrados y la relación espacio-temporal que pueda existir entre ellos, pero además existen evidencias de que el eje HHT participa en las respuestas del organismo a estímulos que pueden catalogarse como estresantes. Las respuestas rápidas tanto de la transcripción del mRNA de la TRH, como de la síntesis y liberación del péptido se han estudiado *in vivo* en respuesta a estímulos de frío en ratas macho, o estimulación por succión de la glándula mamaria en hembras. El cultivo primario de células dispersas de hipotálamo fetal de rata es un sistema experimental que permite el estudio de la biosíntesis de la TRH *in vitro* por medio de una exposición de las células a las moléculas de interés en una forma más accesible y controlada que en el animal vivo eliminando barreras anatómicas y efectos biológicos secundarios.

En este trabajo se estudió: 1) la respuesta de las células TRHérgicas hipotalámicas a la presencia por intervalos de tiempo iguales o menores a 180 min., de efectores que se han identificado como intermediarios de fenómenos de regulación rápida, tales como los activadores de las vías de la proteína cinasa A (PKA): 8Br-AMPC, o de la proteína cinasa C (PKC): TPA y hormonas glucocorticoideas como dexametasona. (DEX) midiendo la cantidad de TRH intracelular y liberada al medio y, 2) el efecto de la presencia de hormonas tiroideas durante los intervalos mencionados en los niveles de expresión de mRNA de la TRH. 8Br-AMPC, TPA o DEX, producen efectos estimulatorios rápidos (180 min. o menos, en comparación a estudios de regulación iguales o mayores a 48 horas) sobre la cantidad de TRH intracelular o liberada al medio, aunque falta por resolverse si dichos efectos son en el nivel transcripcional, traduccional o postraduccional. El 8Br-AMPC tiene una clara función como secretagogo. La DEX produce efectos más rápidos sobre la concentración de la TRH, que 8Br-AMPC o TPA. Las asociaciones entre DEX y 8Br-AMPC o TPA indican que existen interacciones entre las vías implicadas de carácter sinérgico en algunos momentos y con interferencia mutua en otros. Las hormonas tiroideas muestran la capacidad de afectar en tiempos muy cortos el nivel de expresión del mRNA de la TRH. Además se observó que los niveles de hormonas tiroideas determinan la respuesta de las células hipotalámicas a estímulos agudos por distintos efectores.

Este trabajo demuestra que en el hipotálamo fetal de rata *in vitro*, tanto la biosíntesis de la TRH como la expresión del mRNA de la TRH pueden ser regulados en intervalos de tiempo iguales o menores a 3 horas, y que en dicha regulación intervienen tanto mediadores hormonales (hormonas tiroideas y glucocorticoideas) como activadores de segundos mensajeros (proteínas cinasas A y C).

I. INTRODUCCION

A. Generalidades

La relación de un individuo con su ambiente y el mantenimiento de su propia vida requieren de la coordinación espacio-temporal en el funcionamiento de las partes que lo componen mediada por mecanismos de comunicación intercelular e intracelular. En organismos superiores como los mamíferos dicha comunicación involucra factores tales como la distancia entre dichos órganos, la existencia de barreras físicas o fisiológicas, la distribución regional de moléculas efectoras, la capacidad de un tipo celular de discriminar mensajes dirigidos a distintas poblaciones celulares, entre otros parámetros.

En la evolución se han adecuado dos sistemas generales encargados de la comunicación de órganos y de la coordinación de sus funciones: *el sistema nervioso y el sistema endócrino*, los cuales envían señales hacia órganos blanco, determinando el sentido de actividades celulares particulares. La división más simple de ambos sistemas se establece con base en sus peculiaridades anatómicas y en las características intrínsecas de síntesis, liberación, transporte y mecanismo de acción de las señales que producen. Así el concepto de sistema nervioso comprende la existencia de redes de neuronas que se relacionan en las sinapsis con otras células que pueden ser también neuronas, miocitos, o células epiteliales, transmitiendo un mensaje por medio de moléculas como los péptidos, las aminas (noradrenalina, serotonina, dopamina) o moléculas de otro carácter químico (acetilcolina) denominadas genéricamente *neurotransmisores, neuromoduladores o neurohormonas*. El asiento macroanatómico del sistema nervioso lo constituye el neuroeje (encéfalo y médula espinal) y los nervios periféricos. El concepto de sistema endócrino engloba al grupo de órganos conocidos como glándulas, distribuidas en todos los niveles de un organismo que sintetizan y liberan moléculas de distinta naturaleza química: protéicas (insulina), derivados esteroides (glucocorticoides, estrógenos), entre otras.

La adenohipófisis o pituitaria anterior, que es parte del sistema endócrino, es una glándula que sintetiza y libera seis hormonas con funciones metabólicas generales como la hormona de crecimiento o somatotropina (GH, por sus siglas en inglés), o glandulares específicas como la hormona estimulante de la tiroides o tirotropina (TSH, por sus siglas en inglés) [1]. La adenohipófisis está bajo el control neurohormonal del hipotálamo [2].

La observación de que el funcionamiento pituitario depende de un control hipotalámico, planteó la hipótesis general de la existencia de factores encefálicos que estimulan o inhiben la síntesis y liberación de hormonas de la adenohipófisis. Extractos de hipotálamo fueron capaces de liberar *in vivo* e *in vitro* la TSH [3, 4], lo cual llevó a los investigadores a buscar tales factores y aislar en 1969 una molécula de estas características que por actuar sobre la síntesis y liberación de la TSH recibe el nombre de hormona liberadora de tirotrópina o tiroliberina (TRH, por sus siglas en inglés) [5, 6].

A pesar de la ausencia de relación sináptica entre las neuronas del hipotálamo y las células glandulares de la adenohipófisis, es evidente el control nervioso sobre el funcionamiento endócrino. El *área hipotalámica hipofisiotrópica* es el núcleo paraventricular (NPV) y los cuerpos de las neuronas TRHérgicas que contiene, se localizan particularmente en su división parvicelular medial [7]; sus axones terminan en la eminencia media, de la cual liberan a la TRH que es transportada por el sistema capilar portahipofisario hasta la adenohipófisis en donde se une a receptores específicos en los lactotropos induciendo la liberación de la prolactina, hormona que actúa sobre la glándula mamaria [8, 9]; y en los tirotropos, estimulando la síntesis y liberación de la TSH, la cual controla la glándula tiroides estimulando la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas: tetraiodotironina o tiroxina (T_4) y triiodotironina (T_3) [10, 11, 12]. La TRH es degradada por la piroglutamil aminopeptidasa II (PP-II) que es una enzima que remueve por hidrólisis, el residuo L-piroglutamil amino-términal de los polipéptidos, en este caso el tripéptido piroglu-his-proNH₂ (TRH). La PPII se encuentra ligada a la membrana en diversos tejidos de los mamíferos, pero tiene los niveles mas elevados de actividad en el cerebro y mas bajos en la adenohipófisis [13]. Las hormonas tiroideas inhiben la síntesis y liberación de TSH y TRH, estableciendo la retroalimentación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y poniendo de manifiesto el control endócrino sobre la función neural [14, 15] (figura 1).

A medida que ha transcurrido el tiempo el interés por la TRH ha crecido, en parte debido al hecho de que se ha encontrado en diversos sitios (además del NPV y eminencia media), tanto neurales: la corteza cerebral, bulbo olfatorio, hipocampo, otros núcleos hipotalámicos, cerebelo, tallo encefálico y médula espinal [16, 17], como extraneurales: corazón, páncreas, testículos y placenta [18, 19], en donde se le han atribuido funciones potenciales (termorregulación, antagonismo analéptico de drogas, memoria,

EJE HIPOTALAMO - HIPOFISIS - TIROIDES

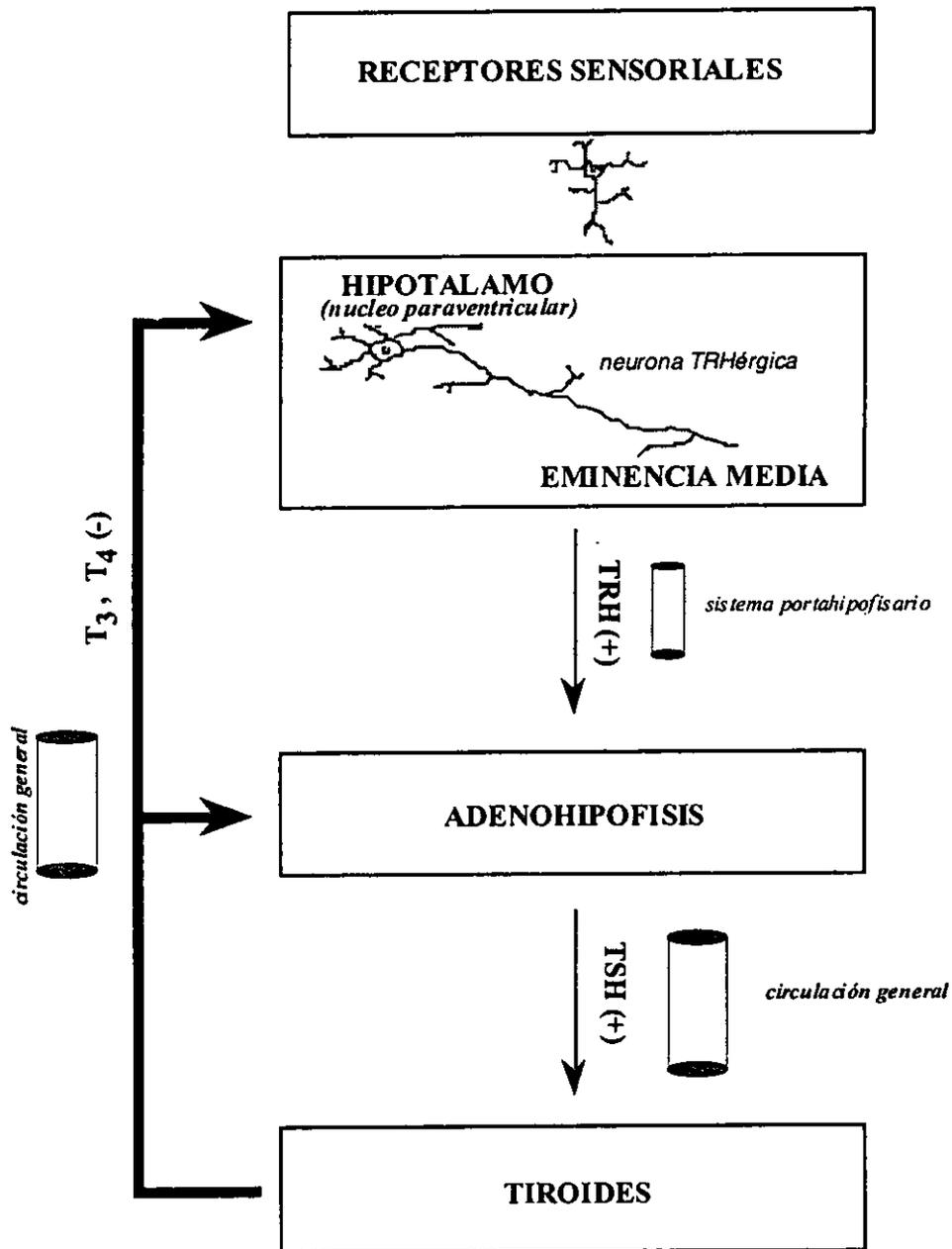


Fig 1. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. El hipotálamo recibe aferencias del tallo encefálico, que proporcionan información sensorial (frio,tacto) y estimulan la liberación de TRH por parte de una subpoblación de células del núcleo paraventricular que proyectan sus terminales hasta la eminencia media. El TRH es liberado al sistema portahipofisario y transportado hacia la adenohipófisis en donde estimula la síntesis y liberación de TSH. Esta hormona a su vez es transportada por la circulación general a la glándula tiroides en donde estimula la síntesis y la liberación de las hormonas tiroideas que también por transporte en la circulación general, producen un efecto de retroalimentación negativa sobre la síntesis y liberación de TRH hipotalámica y TSH adenohipofisaria.

regulación de dolor, estimulación de la motilidad intestinal, secreción de ácido gástrico, vasodilatación, modulación del sistema inmune) distintas a su actividad como neurohormona [20]. Sin embargo su carácter fundamentalmente como neuropéptido hipofisiotrópico sigue generando preguntas respecto a la regulación de los diferentes pasos de su metabolismo desde la biosíntesis hasta su degradación.

El interés particular, en el estudio de la regulación de la biosíntesis hipotalámica de la TRH, radica en que permite explicar como diversos estímulos (neurales u hormonales), son capaces de modificar sus niveles intracelulares susceptibles de liberarse, para coordinar las funciones del eje HHT en condiciones fisiológicas (la ontogenia, en el ciclo circadiano e incluso en el estrés agudo o crónico) [21, 22] o patológicas (hipotiroidismo, hipertiroidismo, trastornos afectivos) [136].

B. Biosíntesis de TRH

Se ha caracterizado el gen de la TRH en el humano [24] y en la rata [23]. La región promotora en el extremo que flanquea a la terminal 5' del gen de la TRH contiene una caja TATA a -29 pb y dos cajas GC a -119 y -693 pb, probablemente involucradas en la actividad basal del promotor. Existen otros elementos importantes para la regulación de la expresión génica entre los cuales se han identificado al menos dos secuencias imperfectas que unen a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPc (CREB; por sus siglas en inglés) así como a AP-1 a -101 y -59 pb [25, 26] esta última también une a la isoforma TR α 1 del receptor de hormonas tiroideas [20]. Además cuatro *medios sitios* de los elementos de respuesta a glucocorticoides a -736 -560 -284, y -210 pb (*medio sitio perfecto*) [27], y otro elemento potencial de respuesta al receptor de hormona tiroidea a -142 pb que posee baja homología con la secuencia consenso [20, 23, 25, 28].

La unidad de transcripción tanto del gen humano como del de rata contiene tres exones separados por dos intrones. El exon 1 codifica para la región 5'- no traducida (5'-NT); el exon 2, para el péptido señal y una pequeña porción del péptido amino terminal; la mayor parte del precursor de la TRH: la pre-pro-TRH, es codificada por el tercer exón [23]. La pre-pro-TRH es una precursora de 242 aminoácidos en el humano y 255 en la rata con una homología entre ambos de 73.3% a nivel de ácidos nucleicos y de 59.5% en su composición de aminoácidos. Además se han identificado seis copias de la secuencia gln-his-pro-gly en la molécula humana [24] y cinco en la de rata [23] flanqueadas por residuos dibásicos arginina y/o lisina [29] que son secuencialmente cortadas por una convertasa y una carboxipeptidasa

para dar origen a este tetrapéptido. La glutaminil ciclasa convierte la glutamina a piroglutámico y la monooxigenasa α -amidante de peptidilglicina (PAM; por sus siglas en inglés) oxida la glicina carboxiterminal en dos pasos para dejar amidada a la prolina y formar la TRH madura, que es un tripéptido: piroglu-his-proNH₂ (figura 2). Los cofactores de la PAM son el zinc, cobre y ácido ascórbico [30, 31, 32].

El procesamiento de la pre-pro-TRH, tanto humana como de rata produce siete péptidos crípticos (encontrando un 44-61 % de homología entre una especie y otra en dichos péptidos) [33, 34].

C. Regulación neural de la biosíntesis hipotalámica de TRH.

Los corpúsculos de la piel que perciben fenómenos tales como tacto-succión, temperatura, dolor, presión, etc., son especializaciones de terminales axónicas de neuronas sensoriales cuyos somas se localizan en los ganglios de las raíces dorsales de la médula espinal. Los estímulos son transmitidos desde la periferia por tractos ascendentes hacia núcleos del tallo encefálico (como el núcleo pálido del rafe fundamentalmente involucrado en transmitir información cutánea al tálamo e hipotálamo) [35] que envían a su vez aferencias a las regiones involucradas en procesar la información.

En el estudio de los factores potencialmente implicados en la regulación de la biosíntesis de TRH, se han identificado aferencias que existen *in vivo* de diversos tipos y procedencias (no solamente del tallo encefálico), en estrecha asociación a las neuronas TRHérgicas del NPV. Los contactos aparentes entre dos neuronas no constituyen suficiente evidencia para demostrar que existe una relación fisiológica entre ambas pero hasta el momento no existe un modelo que explique con precisión la relación entre el origen de una aferencia, el neurotransmisor que libera, la unión de este a un receptor específico en la célula TRHérgica y un efecto claro en respuesta a este estímulo en la biosíntesis de la TRH.

Han sido identificadas aferencias sobre las neuronas TRHérgicas del NPV, tanto de carácter catecolaminérgico procedentes del tallo encefálico [36, 37], como positivas para noradrenalina, neuropéptido Y (NP-Y), proopiomelanocortina (POMC), dopamina β hidroxilasa (DBH) e inclusive TRH procedentes de otros núcleos [38, 39]. Fibras ascendentes catecolaminérgicas desde la región rostral del mesencéfalo llegan al NPV el cual tiene una gran cantidad de receptores a catecolaminas [40]. No obstante, aunque no puede descartarse una participación de tales aferentes en la biosíntesis de la TRH,

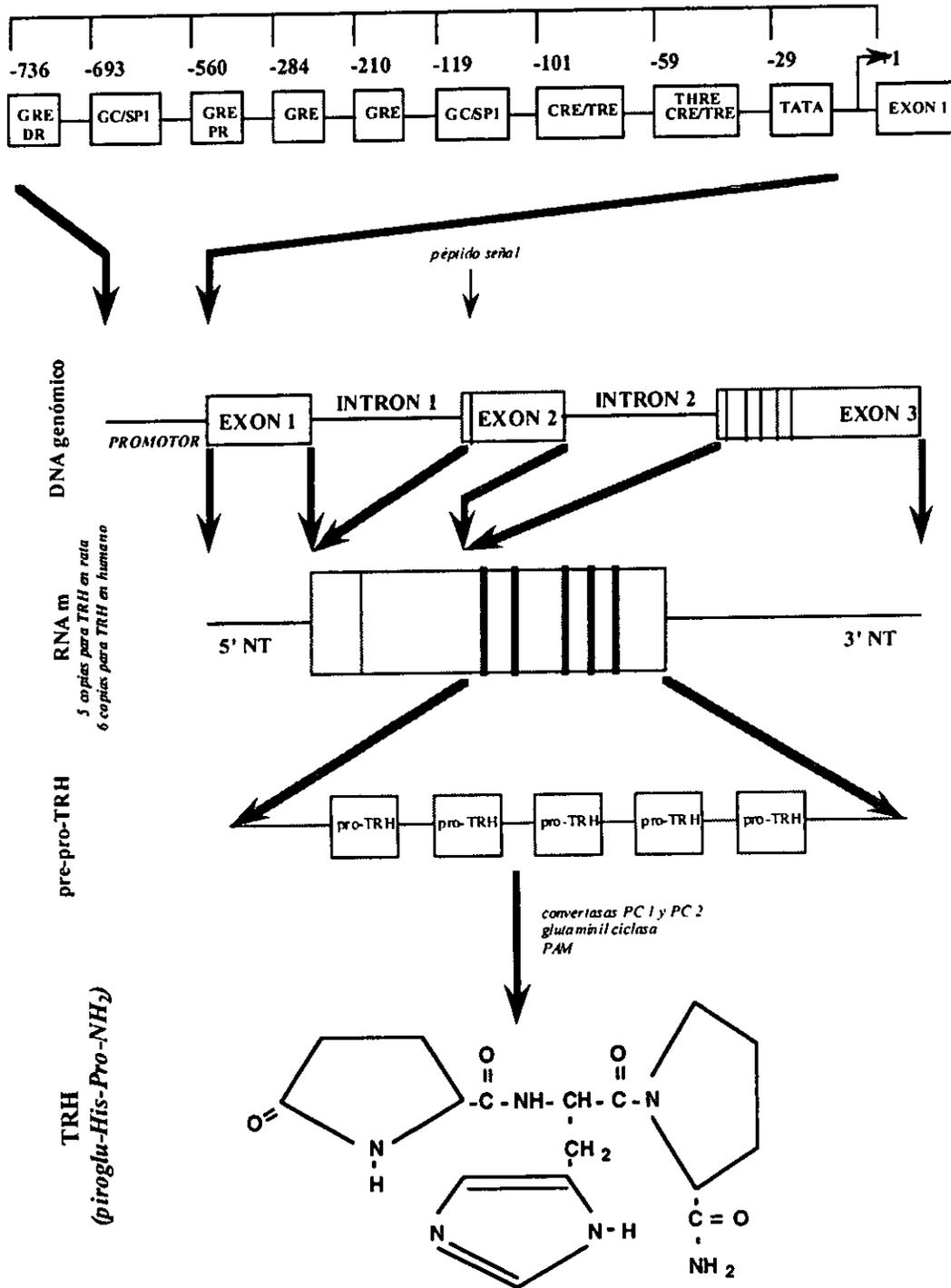


Fig 2. Esquema que muestra los diferentes niveles de la biosíntesis de TRH susceptibles de regulación. En el promotor del gen de TRH existen elementos de respuesta a receptor de glucocorticoides, receptor de hormona tiroidea, CREB, AP-1 que podrían participar en estimular o inhibir la transcripción. El procesamiento del péptido depende del corte en los aminoácidos dibásicos (arginina, lisina) que flanquean la secuencia de gln-his-pro-gly, por parte de las convertasas. La glutaminil ciclasa, forma el piro-glu a partir de glutamina en la amino-terminal y la monooxigenasa alfa amidante de peptidil glicina, amida la terminal carboxilo. Factores como el oxígeno, el ácido ascórbico, el cobre o el zinc entre otros regulan la actividad de estas enzimas y por ende la biosíntesis del piroglu-his-proNH₂ (TRH).

hasta el momento no se han caracterizado a los posibles receptores de los neurotransmisores estudiados en las neuronas TRHérgicas.

Además, hay sinapsis entre células que sintetizan NP-Y y neuronas no TRHérgicas del NPV, que sugieren la participación de NP-Y sobre la regulación de la TRH también en una forma indirecta. NP-Y induce la liberación de somatostatina (SRIF, por sus siglas en inglés) de la eminencia media [41], y fibras de células que sintetizan SRIF inervan células TRHérgicas en el NPV de rata [42].

Se han observado los efectos de varios neurotransmisores sobre el metabolismo de la TRH *tanto in vivo* como *in vitro*. Se ha demostrado por ejemplo, que la NA actúa a nivel de los cuerpos neurales de las neuronas TRHérgicas [17] o mediando la liberación de la TRH en la eminencia media a través de receptores α -1 adrenérgicos [43] durante el estrés por frío. Algunos estudios muestran la liberación de la TRH por catecolaminas en paradigmas diferentes al frío [44]. También ha sido demostrado que la inyección del NP-Y en el tercer ventrículo de la rata inhibe la liberación de TSH, sugiriendo una acción de este neuropéptido sobre la secreción de la TRH [45].

Estudios con modelos como la succión de la glándula mamaria en la lactancia, sugieren la participación de otros neurotransmisores como la serotonina [46], la cual ha sido implicada también en respuestas termorregulatorias actuando a través de vías mesencefálicas sobre el hipotálamo. A pesar del número de receptores a serotonina (5-HT) y la presencia de autoreceptores en las neuronas presinápticas no hay evidencias suficientes para concluir la existencia de un efecto directo sobre las células TRHérgicas [33].

La inervación sobre las neuronas que sintetizan a la TRH (como sobre las demás neuronas) influye en su actividad eléctrica, o promueve mecanismos generales de transducción de señales al interior de la misma conocidos genéricamente como sistemas o vías de segundos y terceros mensajeros, tales como AMPc, GMPc PIP₂, IP₃, DAG, ácido araquidónico, calcio, JUN, FOS, CREB. Los fenómenos intracelulares, generados por estas vías son diversos (activación de canales iónicos, fosforilación y defosforilación de proteínas, movimiento de calcio de pozas intracelulares, activación de factores de transcripción), pero en términos de biosíntesis y en particular de la transcripción del gen en el núcleo, un paso clave es la fosforilación de proteínas mediada por proteínas cinasas. Dos de las vías mejor estudiadas en la regulación de la transcripción génica son la de la proteína cinasa dependiente del AMPc o proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) y la de la proteína cinasa dependiente de diacilglicerol o proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) [47].

D. Regulación endócrina de la biosíntesis hipotalámica de la TRH.

1. Hormonas tiroideas: Las dos principales hormonas tiroideas T_4 y T_3 se sintetizan en los folículos de la glándula tiroides a partir de dos moléculas de tirosina yodadas [48] y afectan: el consumo de oxígeno y la producción de calor, el aparato cardiovascular (incrementan receptores β -adrenérgicos; producen efectos cronotrópicos e inotrópicos sobre el corazón), el funcionamiento respiratorio (impulso hipóxico e hipercápnico sobre los centros respiratorios), la eritropoiesis, el sistema endócrino y el músculo esquelético (recambio óseo y relajación muscular) [49]. Además son muy importantes en el desarrollo embrionario de diversas especies (rana, rata, humano, etc). Pueden ser detectadas en la rata por ejemplo, desde los 4 días de la concepción. Su origen es materno en esta temprana etapa lo cual indica que sí atraviesan la barrera hemato-placentaria [50]. La función tiroidea fetal inicia en la rata en los días estrales 17-18 esto es 5 a 6 días antes del nacimiento.

La transtiretina es una proteína que une hormonas tiroideas (T_4 y T_3) y las transporta desde la circulación al cerebro a través de los plexos coroideos y el líquido cerebroespinal. La T_3 que se encuentra en el cerebro es producida predominantemente por una reacción de desiodación parcial de la T_4 sérica, catalizada por la enzima desiodasa tipo II. Esta enzima se localiza principalmente en el sistema nervioso central, hipófisis y tejido adiposo café y tiene una K_m de 1-2 nmol/L [51]. Las concentraciones de T_3 son bajas en el cerebro fetal al día 17 y se incrementan más de 10 veces hacia el término de la gestación esto es aproximadamente el día 21, cuando la contribución de T_4 materna a las pozas de T_4 extratiroideas fetales representa el 17.5 ± 0.9 % [52]. TRH, TSH, T_4 y también T_3 se incrementan marcadamente en el suero al nacimiento. Independientemente de su origen (materno o fetal), el efecto de retroalimentación negativa de las hormonas tiroideas sobre el eje es uno de los eventos más tardíos de la ontogenia [51].

Las hormonas tiroideas modulan la presencia de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y corticosterona (B) (ambas hormonas involucradas en las respuestas del organismo a estrés), en las ratas neonatales que exhiben un período de respuestas disminuidas al estrés durante las primeras dos semanas de vida [53]. En el adulto existen diversas evidencias del papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la biosíntesis de la TRH. El hipotiroidismo inducido farmacológicamente (propiltiouracilo o metimazol) en ratas adultas, produce incremento tanto en los niveles de mRNA de la pro-TRH como de la inmunorreactividad para la pro-TRH o la TRH, casi exclusivamente en las neuronas

de la división parvicelular medial del NPV consideradas como parte del *sistema tuberoinfundibular*. Tal efecto se bloquea por la administración de levotiroxina, o se revierte al mantener una liberación localizada unilateral de T_3 , además que en este último caso se demuestra un efecto directo de las hormonas tiroideas sobre las células del sistema tuberoinfundibular. Se descarta en estos resultados la participación de catecolaminas pues ni el corte de las vías ascendentes catecolaminérgicas de la región rostral del mesencéfalo, ni la administración del antagonista adrenérgico 6 hidroxidopamina (6-OHDA) modifica la respuesta observada [41, 54].

El hipotiroidismo provocado por tiroidectomía en ratas, produce incremento de mRNA de la pro-TRH en hipotálamo anterior, pero en contraste a lo esperado los niveles de la TRH en varios núcleos como el NPV y en la eminencia media son inferiores con respecto a los controles, a los 7 y 14 días posteriores a la cirugía. El incremento concomitante de TSH sugiere que la TRH se está liberando al sistema porta [55], aunque hay reportes en donde la liberación de la TRH a la circulación portahipofisaria no se modifica en el hipotiroidismo, con respecto al animal eutiroideo, mientras que disminuye en el hipertiroidismo inducido con la administración de T_4 . La lesión de los NPV produce un decremento en la liberación de la TRH con respecto al control [56].

Uno de los mecanismos de acción propuestos para explicar los efectos descritos de las hormonas tiroideas es la modificación de la expresión génica por medio de la unión y activación de receptores específicos que actúan como factores de transcripción. Los receptores a hormonas tiroideas pertenecen a la familia de las proteínas "dedos de zinc"[27] y derivan de dos genes: *c-erbA- α* y *c-erbA- β* . El gen *c-erbA- α* por *splicing alternativo* da lugar a las isoformas TR- α_1 y TR- α_2 [57]. TR- α_2 no une a la hormona tiroidea y puede inhibir la función de otros TR's [58, 59, 60]. El gen *c-erbA- β* por uso alternativo de exones produce las isoformas TR- β_1 y TR- β_2 que difieren entre sí por su terminal amino. El RNAm de TR- β_2 se encuentra casi exclusivamente en la pituitaria [61, 62], hipotálamo [63] y en muy bajos niveles en otros lugares del sistema nervioso central y la periferia [64, 65].

La cotransfección de vectores que contienen fragmentos del promotor de la TRH unido a luciferasa y secuencias para los receptores a hormonas tiroideas (h, de humano; r, de rata): hTR α_1 , hTR β_1 , rTR β_1 , rTR β_2 , en células de neuroblastoma demostró que independientemente de la isoforma del receptor estudiada la actividad transcripcional del promotor del gen de pro-TRH es inhibida por T_3 ; en contraste, las formas no ligadas de los mismos receptores, excepto hTR α_2 , producen activación del gen de hTRH [66].

Se ha sugerido que la isoforma β_2 de hTR restringida al sistema nervioso central tiene un efecto único sobre la regulación negativa por T_3 sobre diversos genes, por ejemplo el de la TRH, y que dicha actividad depende de la región mapeada en los aminoácidos 89-116 del amino termino [67].

2. Glucocorticoides: Los glucocorticoides se producen en las glándulas suprarrenales en respuesta a la acción de la ACTH hipofisaria, y sus efectos generales en el organismo se manifiestan mediante incrementos en la actividad de las enzimas glucogénicas del hígado, así como aumento de glucosa y aminoácidos séricos con el fin de preparar al organismo para enfrentar diversas condiciones de estrés. Además afectan el funcionamiento de algunos tipos celulares del sistema inmune, inhibiendo la respuesta inflamatoria. De manera semejante a las hormonas tiroideas, parte de sus efectos ocurren sobre la expresión génica, por medio de factores de transcripción que son al mismo tiempos receptores específicos de estas hormonas. Los receptores de glucocorticoides también pertenecen a la familia de las proteínas “dedos de zinc” [27]. El acceso de los glucocorticoides a sus receptores específicos está limitada por la acción de la 11-hidroxiesteroide deshidrogenasa, una enzima que se expresa en regiones cerebrales como el tálamo, hipocampo e hipotálamo, y que inactiva a la corticosterona plasmática que llega a los tejidos [68, 69].

El eje hipotálamo-hipófisis-tiroides tiene una estrecha relación con el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, como lo muestra el efecto de los glucocorticoides en la biosíntesis hipotalámica de la TRH, que puede ser tanto estimulatorio como inhibitorio dependiendo del tiempo y la concentración del estímulo esteroideo [70].

La restricción calórica (ayuno) tanto en el humano como en la rata se asocia con niveles plasmáticos incrementados de glucocorticoides y disminuidos de hormonas tiroideas, así como decremento del 50% en los niveles de mRNA de la pro-TRH en el NPV [71]. En contraste la administración sistémica de leptina (una proteína que inhibe la ingesta de comida e incrementa el gasto de energía a través de receptores hipotalámicos específicos) en ratones en ayuno atenua la elevación de B y bloquea la disminución plasmática de T_3 y T_4 . [72]

Estudios por hibridación *in situ* en ratas adrenalectomizadas han mostrado que 10-12 días después de cirugía se encuentran elevados los niveles de mRNA tanto de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés) como de pro-TRH en el NPV, mientras que la administración de DEX o B por ese mismo período inhiben el RNA de ambas hormonas también en el NPV. Estos efectos no se

observan en el hipotálamo lateral. Tales resultados sugieren una participación de los glucocorticoides como inhibidores en este caso a nivel hipotalámico del funcionamiento del eje HHT, sin embargo es difícil establecer esta conclusión porque los animales tratados con glucocorticoides perdieron peso, y como se citó la privación de calorías que lleva a la pérdida de peso, se asocia a una disminución en los niveles de mRNA de la pro-TRH en el NPV [73].

Hay una fuerte expresión del mRNA de la pro-TRH, así como de inmunoreactividad tipo receptor de glucocorticoides (detectada con anticuerpos monoclonales), en varios núcleos hipotalámicos, incluyendo las células TRHérgicas de la división parvicelular medial (pero no magnocelular) del NPV de ratas macho adultas [74, 75, 76].

II. ANTECEDENTES

El estudio de las células *in vitro* ha permitido que estas puedan aislarse de los elementos anatómo-fisiológicos que están relacionados con ellas y que dificultan su tratamiento y análisis. En este sentido se han llevado a cabo trabajos en cultivos de células que sintetizan TRH los cuales se exponen a la acción de diversas moléculas para identificar su participación como reguladores del metabolismo del péptido, principalmente hormonas tiroideas y glucocorticoides, en donde se han observado respuestas dependientes del tiempo de tratamiento, de las particularidades de las células estudiadas, de sus condiciones de cultivo, etc. Un ejemplo de ello es el cultivo de células CA77 (una línea celular de tumor C tiroideo), en el cual los glucocorticoides muestran un efecto estimulador sobre la expresión del gen de la TRH, medida como cambios en la concentración del mRNA de la TRH, precursores de la TRH o el tripéptido mismo [77].

En células de adenohipófisis la presencia de hormonas tiroideas por un período de 2 a 14 días incrementa el contenido de TRH, y este efecto es potenciado por Dex. Además la combinación de T₃ y Dex produce un incremento en los niveles de RNAm y en el número de células que expresan pro-TRH [78]. El tratamiento con Dex (o corticosterona) en forma aislada por un rango de 4 a 18 días incrementa el mRNA de la pro-TRH en las mismas células [79].

Uno de los objetivos del cultivo celular en el estudio de la TRH es el análisis de la regulación de la síntesis del neuropéptido en las células *hipotalámicas*, por la participación que tienen algunas de ellas en el control del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas. Los trabajos tanto *in vivo* como *in vitro* en los cuales se ha investigado la regulación de la biosíntesis de la TRH en este grupo de células, en general se han enfocado en los cambios que ocurren con los niveles del mRNA de la TRH, los precursores de la TRH o el mismo neuropéptido bajo la presencia constante de diversos efectores, en lapsos iguales o mayores a 48 h. Se han realizado ensayos en cultivos primarios de neuronas diencefálicas de rata fetal, mantenidos hasta por 21 días con agentes de diferenciación. En particular la presencia de bromodeoxiuridina por 4 días produce incremento en el contenido celular de la TRH, y el efecto constante por 14 días incrementa el nivel de mRNA de la pro-TRH. El tratamiento del mismo tipo de cultivo con Dex 10⁻⁸ M aplicada a partir del segundo día de cultivo y mantenida por 7 días, en presencia de 8Br-AMPC, el cual se agrega desde el inicio del cultivo y se mantiene por 4 días, produce incremento tanto del mRNA de la pro-TRH como del péptido maduro [80, 81]. Sin embargo, además de las funciones conocidas de los sistemas

hipotálamo-hipofisarios como coordinadores de múltiples actividades del metabolismo basal de un organismo, hay un interés creciente por conocer su participación en la respuesta rápida a diversos estímulos, por lo que ha sido necesario realizar ensayos en períodos de tiempo cada vez más reducidos (horas o minutos). Un ejemplo de esto es el incremento que se observa en el mRNA de la TRH en el NPV a las 6 h de la exposición de ratas macho adultas al frío, un efecto que inclusive sobrepasa a la inhibición en la expresión del mensajero de la TRH producida por altos niveles circulantes de hormona tiroidea [82].

En 1993 Uribe, et al., realizó un estudio *in vivo* con el objetivo de determinar si la biosíntesis de la TRH está coordinada con su liberación en la eminencia media, partiendo de la idea de que la cantidad de un péptido liberado como respuesta a un estímulo es en algunos casos función de la concentración intracelular del péptido, y que a su vez dicha concentración depende de la tasa de biosíntesis. Para ello se realizaron ensayos en modelos de estrés como el frío y la succión de la glándula mamaria en la lactancia, en donde se ha observado además activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, paralela a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. En la succión, se observa un incremento significativo del mRNA de la pro-TRH a los 30 minutos en el NPV, que desaparece a la hora. En el núcleo preóptico anterior (POA-AH, por sus siglas en inglés; involucrado en respuesta al frío) en contraste, se detecta una disminución significativa de mRNA de la TRH. Paralelamente al incremento del mensajero se elevan los niveles de prolactina, corticosterona y T_3 en sangre, lo que es una forma indirecta de medir tanto la liberación de TRH hacia la pituitaria como la activación del eje adrenal en respuesta al estrés. En la exposición al frío se encontró un aumento significativo del mRNA de la pro-TRH a los 30 minutos en el POA-AH y a los 60 min en el NPV, el cual disminuye a niveles control en ambos núcleos a las 2 hrs. Hay incrementos significativos en los niveles plasmáticos de corticosterona a los 60 minutos y de T_3 a los 120 minutos. Las conclusiones del reporte citado [83] pusieron de manifiesto que: 1) La respuesta en la expresión de mRNA de TRH en el NPV es rápida; 2) El incremento en los niveles de mRNA de la TRH en el NPV es transitorio y; 3) Existe incremento también rápido de varias hormonas en el suero (como las tiroideas y los glucocorticoides).

La velocidad de la respuesta sugiere una participación de las aferencias que llegan al NPV que estaría mediada por la liberación de neurotransmisores, la unión a receptores específicos en las neuronas TRHérgicas y la activación de segundos mensajeros. Se realizaron por lo tanto, ensayos con db-AMPC (análogo de AMPC, un activador de PKA) y con TPA (análogo de DAG, un activador de PKC) con el

objetivo de probar si estas vías de segundos mensajeros reproducen los efectos observados *in vivo* apoyando la idea de una respuesta en la biosíntesis de la TRH generada por estimulación sináptica.

Los resultados reproducen parcialmente el efecto observado *in vivo* mostrando que si bien se incrementan los niveles de mRNA de la pro-TRH en respuesta a ambos estímulos, la respuesta no es tan rápida ni transitoria [84].

Este trabajo proporciona indicios de que la expresión del mRNA de la pro-TRH en el frío o en la succión puede ser consecuencia de una influencia neural, aunque falta por precisarse si este efecto es sobre un incremento en la transcripción o sobre un incremento en la estabilidad del mensajero. Por otra parte aún en el caso de que los mecanismos mencionados satisfagan la pregunta sobre la rapidez de la síntesis, se requiere explicar qué evento contribuye a que el aumento en los niveles de mRNA de la TRH se mantenga durante un período muy breve.

Las hormonas tiroideas y los glucocorticoides son reguladores negativos del eje hipotálamo hipófisis tiroides. Tienen la capacidad de estimular o inhibir tanto la expresión de diversos genes (como el de pro-TRH) como de afectar la estabilidad de diferentes RNA mensajeros [85, 66]. Estas características y su rápido incremento en el suero de los animales utilizados para los ensayos descritos, sugieren una participación de tales hormonas en la regulación de la biosíntesis de la TRH en períodos breves.

Para probar el efecto hormonal potencial sobre la síntesis de la TRH se trataron cultivos primarios de células dispersas de hipotálamo a diferentes períodos de tiempo considerados como cortos (con relación a los tiempos de respuesta a hormonas, habitualmente reportados en la literatura): 1, 2 ó 3 h, con Dex 10^{-8} M (un análogo de glucocorticoides) en forma aislada o en combinación con los análogos de segundos mensajeros ya probados (8Br-AMPc y TPA) y se determinaron sus efectos sobre los niveles de mRNA de la pro-TRH. La acción de cada droga por separado en los tiempos ensayados tiene un efecto estimulador sobre los niveles del mensajero (excepto TPA a 1 hora). La asociación de Dex con TPA produce a las 2 y 3 h una respuesta mayor que la obtenida con la acción de cada droga por separado. El efecto opuesto se obtiene cuando se asocia Dex a 8Br-AMPc pues su presencia disminuye la magnitud del efecto estimulador que se presenta con el 8Br-AMPc cuando se administra en forma aislada. Ambos efectos hablan de comunicación entre diversas vías de señalización en el interior de la célula. El mRNA de la pro-TRH responde en una forma dependiente de la dosis del glucocorticoide sintético con un comportamiento inhibitorio en las concentraciones 10^{-10} , 10^{-9} y 10^{-4} M y estimulador en el rango 10^{-8} - 10^{-6} [86].

III. HIPOTESIS.

A. El efecto rápido producido por glucocorticoides o por drogas que incrementan la actividad de PKC ó PKA, sobre el aumento de los niveles de mRNA de la TRH repercute en los niveles de péptido procesado (TRH).

B. Algunos de estos agentes (glucocorticoides o activadores de proteínas cinasas A o C) pueden inducir la liberación *in vitro* de la TRH en células hipotalámicas.

C. El nivel de hormonas tiroideas puede influir en la expresión de mRNA de la TRH por parte de las células hipotalámicas en cultivo, ante la presencia por intervalos cortos de tiempo, de efectores que produzcan cambios en los niveles de AMPc intracelular o activación de la PKC.

IV. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL DEL GRUPO

Estudiar la regulación de la biosíntesis hipotalámica de la TRH.

B. OBJETIVOS PARTICULARES DEL PROYECTO

1. Determinar cual es el efecto de la presencia por tiempos cortos (10, 20, 30, 60, 120 y 180 minutos) de activadores de PKA o PKC y de glucocorticoides, en forma aislada o en combinación sobre los niveles de la TRH en cultivos primarios de células dispersas de hipotálamo fetal de rata.

2. Determinar cual es el efecto de la presencia de las hormonas tiroideas por tiempos cortos en la expresión del mRNA de la TRH en cultivos primarios de células dispersas de hipotálamo fetal de rata.

3. Determinar el efecto de la presencia de hormonas tiroideas y glucocorticoides durante todo el período de cultivo, en la expresión del mRNA de la TRH de células dispersas de hipotálamo fetal de rata.

V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

A. Realizar cultivos primarios de células dispersas de hipotálamos de fetos de rata de 17 días de gestación.

B. Para ensayos de contenido y liberación:

- 1. El último día de cultivo (14 o 18 días) tratar a las células con alguna de las siguientes drogas o sus combinaciones: 8Br-AMPC 1 mM, TPA 100 nM o DEX 10 nM, por 10, 20, 30, 60 120 y 180 minutos.**
- 2. Realizar una semipurificación de las células y de los medios de cultivo para cuantificar la concentración de la TRH por RIA.**
- 3. Cuantificar las proteínas totales por el método de Lowry [87] para corregir los valores de la TRH.**

C. Para ensayos sobre el nivel de mRNA de la TRH:

- 1. Realizar una curva dosis-respuesta tratando a las células con T_3 en un rango de dosis de 10 pM a 10 μ M por 3 y 24 horas.**
- 2. Cultivar a las células con T_3 1 nM, B (corticosterona) 100 nM o T_3 1 nM + B 100 nM por 14 días.**
- 3. Cultivar células con T_3 1 nM por 14 días y al término del cultivo tratar por 1 h con DEX 10 nM, B 100 nM o T_3 1 nM.**
- 4. Extraer el RNA total de las células por el método de Chomczynsky [88].**
- 5. Realizar transcripción reversa.**
- 6. Amplificar por PCR los cDNAs de la TRH y de la enzima G3PDH (como control interno).**
- 7. Analizar los productos de PCR por densitometría asistida por computadora.**

D. Cultivar células con T_3 1 nM por 14 días y realizar inmunocitoquímica para la TRH.

VI. MATERIALES Y METODOS

A. Cultivo primario de células dispersas de hipotálamo:

1. Animales.- a) Frotis: Se esterilizó en el mechero un asa bacteriológica y con ella se tomó una gota de agua que se colocó en un portaobjetos. Con la misma asa se tomó una muestra celular de la pared vaginal de ratas Wistar adultas. Se frotó el asa suavemente sobre la gota para depositar la muestra. El procedimiento se repitió para 40 ratas. Se dejó secar el frotis. Se tiñó con hematoxilina y eosina (ver **apéndice**) en el siguiente orden: introduciendo el portaobjetos en hematoxilina por 7 minutos, luego en agua destilada por 8 minutos, en eosina por 1 min y finalmente en alcohol al 96 % por 30 seg. Se dejó secar el portaobjetos. En microscopio de luz con el objetivo 10 X, se determinó la etapa del ciclo estral en que se encontraba cada animal dependiendo de la morfología celular: estro, diestro, proestro-estro o proestro.

b) Cruza y determinación de preñez: Se seleccionó a las ratas que se encontraban en proestro o proestro-estro y se colocaron con ratas macho por aproximadamente 18 h para favorecer el apareamiento. Al término de este lapso se separaron a las hembras de los machos y se consideró ese día como el primero de gestación. Después de 17 días se determinó el estado gestacional por palpación abdominal.

2. Técnica de cultivo.- a) Preparación de pozos o cajas de cultivo: Para sembrar a una densidad de 600,000 células se utilizaron pozos de 16 mm de diámetro, y cuando la densidad requerida fué de 2,700,000 se sembró en cajas de 35 mm de diámetro (poliestireno, estériles; Costar). Para propiciar una buena adhesión de las células en monocapa a sus recipientes de cultivo se cubrió la superficie de los pozos y las cajas con 0.5 y 1 ml respectivamente de una solución de 30 µg/ml de poli-D-lisina (P.M. 30,000-70,000; Sigma) y se dejaron reposar por al menos 2 horas al final de las cuales se lavó cada recipiente dos veces con solución Hank's [89] (ver **apéndice**), dejando 1 ml de la misma hasta la siembra.

b) Disección: El día 17 de gestación se anestesió cada rata gestante con pentobarbital sódico intraperitoneal a razón de 33 mg/kg de peso corporal (0.4 ml aprox. por rata. Anestosal; Pfizer), y después se realizó antisepsia del abdomen con cloruro de benzalconio 1:1000 en H₂O (Benzalkon;

Brovel). Se realizó una incisión longitudinal de la pared abdominal, se localizaron los dos cuernos uterinos ocupados por los fetos (11 ± 1.25 fetos por rata) que se extrajeron en grupos de tres, colocándolos sobre una tarjeta estéril bajo el microscopio estereoscópico. Se sujetó la cabeza con unas pinzas para realizar una incisión con el bisturí, en una línea imaginaria que conecta los arcos superciliares al borde superior del pabellón auricular. El fragmento separado permite exponer el hipotálamo y hacer un corte anterior al quiasma óptico, dos en sendos surcos laterales y uno posterior que incluye cuerpos mamilares. Los hipotálamos así disecados se agruparon en un máximo de 8 en 1 ml de solución Hank's.

c) Dispersión: Los hipotálamos colectados se lavaron dos veces con solución Hank's y se cortaron en varios fragmentos con las puntas de unas tijeras. Los fragmentos hipotalámicos se transfirieron con una pipeta Pasteur estéril a un tubo que contenía 2 ml de la mezcla de DNAsa tipo I (0.28 mg/ml; Sigma) + Tripsina tipo III (0.25 mg/ml; Sigma), y se incubaron por 15 min a 37°C agitando manualmente a los 5 y 10 min. Transcurrida la incubación se agregaron inmediatamente 200 µl de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés; Gibco-BRL) para detener la reacción enzimática, seguidos por 200 µl de DNAsa tipo I (0.28 mg/ml; Sigma). El contenido de los tubos que se tenían con hipotálamos y enzimas se agruparon en uno solo que se puso a centrifugar a 1500 rpm por 4 min., a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en un volumen correspondiente a 100 µl /hipotálamo de DMEM suplementado (DMEM-S, ver **apéndice**). Luego se llevó a cabo una dispersión mecánica utilizando 3 pipetas Pasteur con diámetros de la punta progresivamente más pequeños pasando los fragmentos de tejido del mayor al menor, 10 veces por cada pipeta. Una vez disgregado el tejido se centrifugó a 1500 rpm por 4 min a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 5 a 10 ml de DMEM-S dependiendo del número de hipotálamos.

d) Siembra: Se contó el número de células vivas y muertas por el método de exclusión por azul tripano (1X). Cargando cada uno de los dos cuadrantes de una cámara de Neubauer con 10 µl de la mezcla de 15 µl de la suspensión celular y 15 µl del colorante (1:10). Los cálculos necesarios para determinar el volumen de siembra, el rendimiento y la viabilidad se realizaron con las siguientes formulas:

Para obtener el número de células por microlitro:

$$\frac{(\text{No. células vivas})(\text{Factor de dilución})(K)}{(\text{no. de cuadros contados de } 0.05\text{mm})} = \# \text{ de células/mm}^3$$

donde el factor de dilución es 2; K=4000 y No de cuadros=800 [90]

Para obtener el número de células en la suspensión celular:

$$(\text{No de células/microlitro}) \times (\text{ml de suspensión})$$

El volumen de suspensión requerido para sembrar a la densidad deseada (0.6×10^6 células/pozo o 2.7×10^6 células/plato) se obtiene conociendo la cantidad total de células en el volumen total de la suspensión.

Para determinar viabilidad:

$$\frac{\text{No. de células vivas}}{\text{No. células totales}} \times 100 = (\%)$$

Para determinar rendimiento:

$$\frac{\text{No. de células vivas}}{\text{No. total de hipotálamos}} = (\text{células/hipotálamo})$$

e) Mantenimiento del cultivo: El día de siembra se contó como el número 0 del cultivo y a partir de ese momento se mantuvo a las células en una incubadora (NAPCO) a 37°C , en aire humidificado, y CO_2 al 7 %. Al cuarto día de cultivo para los ensayos de contenido y liberación de la TRH se agregaron 5 μl de citosina arabinofuranósido 10 μM (Sigma) a las cajas de 35 mm. Para los ensayos sobre el nivel mRNA de la TRH en respuesta a tratamiento hormonal, se realizó cambio de la mitad del volumen de siembra del medio de cultivo, es decir, se retiraron 250 μl de los pozos o 1 ml de las cajas *de medio condicionado* (medio modificado bioquímicamente por el metabolismo de las células con las que se ha incubado) [91] y se sustituyó el mismo volumen que se retiró con DMEM-S fresco que contenía 1.1 o 5 μl de citosina arabinofuranósido 10 μM (Sigma) para inhibir la proliferación de la glía. Después cada 48 hrs se realizó el mismo cambio descrito pero sin citosina, hasta los 14 o 18 días en que se trató y cosechó a las células.

f) Tratamiento y cosecha.- Tratamientos para estudiar la TRH intracelular y liberada al medio: El DIV 14 o 18 se reemplazó el medio de cultivo de cada pozo o caja por medio de cultivo que contenía la droga en estudio: AMPc 1 mM, Dex 10^{-8} M, TPA 10^{-7} M o sus combinaciones. Debido a que el AMPc (db u 8 Br) está disuelto en PBS, los resultados de las células tratadas con esta droga se compararon contra

células mantenidas en DMEM-S. Dex y TPA se prepararon disolviéndolas en DMSO (Merck), y para el tratamiento de las células se diluyeron en DMEM-S para una concentración final de DMSO de 0.05%, por lo que esta dilución se empleó como control al momento del tratamiento. Los tratamientos se realizaron para cada uno de los siguientes períodos: 10, 20, 30, 60, 120 o 180 min al final de los cuales se recuperaron los medios de cultivo y se congelaron inmediatamente a -20°C para su análisis cromatográfico. Las células adheridas al plato se lavaron dos veces con PBS 1x y se guardaron con 1 ml de ácido acético a -20°C hasta el proceso de extracción de TRH.

Tratamientos para estudiar efectos en mRNA de pro-TRH: Para estas células el procedimiento para tratarlas fué el mismo descrito. Se cosecharon extrayendo la mayor cantidad posible del medio de tratamiento, el cual se desechó y congelando inmediatamente las células en hielo seco para después mantenerlas a -70°C hasta su procesamiento.

B. Extracción de la TRH

1. Extracción de TRH intracelular: Las cajas almacenadas a -20°C se depositaron en hielo. Se agregaron 500 μl de metanol absoluto a 4°C y se raspó el fondo de la caja con el émbolo de una jeringa. Se recuperó la suspensión celular obtenida y volvieron a agregarse a la caja 0.5 ml de metanol absoluto, se repitió el raspado y recuperación de la suspensión. Se agitó el tubo de la suspensión y se almacenó toda la noche a -20°C , o 2 horas a -70°C . Luego se centrifugó a 14000 rpm a 4°C por 47 min. Las pastillas se guardaron para determinación de proteínas y el sobrenadante fué transferido a tubos de vidrio de 12 x 75 mm para liofilizarlo en un concentrador de muestras por medio de vacío (Hidro-vac; Savant) durante aproximadamente 3 horas. Los concentrados fueron almacenados a -20°C hasta su uso para radioinmunoensayo.

2. Extracción de TRH liberada al medio de cultivo: Para la extracción de la TRH en el medio de cultivo se empleó la técnica de cromatografía de intercambio hidrofóbico utilizando cartuchos con columna de C-18 (Sep-Pak; Millipore). Los cartuchos se activaron haciendo pasar un tren de 2 ml de metanol absoluto, 5 ml de ácido trifluoroacético (TFA, por sus siglas en inglés) 0.1 %, 2 ml de acetonitrilo absoluto, 5 ml de TFA 0.1%, y 5 ml de agua grado cultivo. Después de cada tren se cargo la

muestra en el cartucho activado a una velocidad aproximada de 12 gotas/min, y el eluido se recuperó en un tubo para liofilizar, luego secuencialmente se lavó el cartucho con 1 ml de agua grado cultivo por tres veces para eliminar sales y otros componentes hidrofílicos del medio, 1 ml de metanol al 50%, 1 ml de metanol al 80% y 1 ml de metanol absoluto para liofilización y radioinmunoensayo. Al terminar cada secuencia de elución se repitió el tren de activación para reutilizar el cartucho hasta un total de 6 ocasiones.

C. Radioinmunoensayo de la TRH (RIA):

1. Preparación de estándar interno sintético: Se preparó una solución de 2.5 µg de la TRH disueltos en 25 µl de ácido acético al 0.01%. De esta solución se tomaron 5 µl y se diluyeron con 133 ml de buffer 50 mM de fosfatos (**ver apéndice**) a pH 7.5 con 0.25% de albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) y 150 mM de NaCl. Se prepararon entonces alícuotas de 1 ml (3.75 pg de TRH/µl de solución) y se congelaron en -20°C.

2. Preparación de estándar hipotalámico: Se extrajeron hipotálamos de rata adulta Wistar hembra o macho, de 54 a 63 mg de peso cada uno. Se realizó una dilución 10% (P/V) con 2.5-2.7g de tejido hipotalámico (40 a 50 hipotálamos) en ácido acético 2N, y se homogenizó, después se centrifugó a 10,000 rpm en 4°C por 30 min. Se desechó la pastilla y el sobrenadante se extrajo con metanol absoluto frío (llevado a 90% de concentración final de metanol) dejando a -20°C toda la noche. Al terminar el reposo, se centrifugó a 10,000 rpm en 4°C y nuevamente se desechó el pellet, se concentró al sobrenadante aproximadamente a 20 ml. Se deslipidizaron en tres ocasiones, 20 ml de sobrenadante con 20 µl de eter saturado con ácido acético al 20 %. Cada fase precipitada se desechó. La fase líquida se extrajo con metanol absoluto (90% de la concentración final de metanol) y se dejó a -20° C toda la noche, después de lo cual se centrifugó a 10,000 rpm en -10° C por 30 min, desechando el pellet y liofilizando el sobrenadante el cual se resuspendió en 15 ml de una mezcla 1:1 de metanol absoluto y ácido acético al 20 %, finalmente se centrifugó dicha dilución y se prepararon alícuotas en tubos de vidrio de 20, 40, 80 y 160 µl las que se liofilizaron y congelaron a -20°C.

3. Técnica: curva estándar y muestras: La curva estándar se preparó con triplicados de las siguientes muestras que contenían 300 μl de volumen final, excepto los Totales:

a) Ruido de fondo (rf): tubos vacíos.

b) Totales (T): TRH marcada con ^{125}I a razón de 5000 cuentas por minuto (cpm) por tubo aproximadamente, en 100 μl de buffer fosfatos 50 mM (bf 50 mM).

c) Unión inespecífica (NSB): 200 μl de bf 50 mM + 100 μl de ^{125}I .

d) Unión cero (B0): 100 μl de bf 50 mM + 100 μl de buffer con anticuerpo específico contra la TRH (R2, 1:100. Dilución final 1:30000) + 100 μl de ^{125}I [92]. Para valorar la capacidad del anticuerpo de unir a la hormona marcada radiactivamente (medición en porcentaje).

e) Concentraciones conocidas de TRH sintético: 100 μl de bf 50 mM + 100 μl de buffer conteniendo cada una de las siguientes concentraciones: 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 o 2000 pg de TRH y 100 μl de ^{125}I . Para determinar qué porcentaje de hormona tiroidea marcada es desplazada de su unión al R2 por TRH fría (no marcada).

f) Tubos de estándar sintético con 10, 25, 50, 75 o 100 μL del stock de estándar sintético (ver apéndice): volumen necesario por muestra de bf 50 mM para completar 100 μl + 100 μl de R2 + 100 μl de ^{125}I .

g) Tubos de estándar hipotalámico con la pastilla de la liofilización de 20, 40, 80 o 160 μL del stock: 100 μl de bf 50 mM + 100 μl del R2 + 100 μl del ^{125}I .

h) Muestras: A las muestras se les agregó 100 μl de bf 50 mM para reblandecer el pellet liofilizado, se agitaron y después se les agregó 100 μl de R2 y 100 μl de ^{125}I . Todos los tubos se agitaron y se dejaron en reposo 48 hrs a 4° C. Después del reposo se agregó 1 mL de etanol absoluto a -20° C excepto a los tubos rf y T. Se centrifugó a 3000 rpm por 30 min. El sobrenadante fué retirado y se leyó en un contador de radiación γ (1275 milligama; LKB) durante un minuto para cada muestra.

4. Optimización de métodos: a) Ensayos de interacciones del RIA para la TRH (R2): En los ensayos que se llevaron a cabo para analizar el efecto de diversas drogas sobre el nivel de la TRH hipotalámica se emplearon dos tipos de controles: DMEM-S como medio de carácter hidrofílico (para el 8Br-AMPC que se diluyó en un amortiguador de fosfatos) y DMEM-S + DMSO (Menos del 0.05 % de concentración final), como medio de carácter hidrofóbico (para DEX y TPA, diluídos en DMSO). Antes de los tratamientos se intentó descartar alguna posible interacción del anticuerpo R2 con factores

diferentes a la TRH (desconocidos, o conocidos como la dexametasona) presentes en ambos controles. Los radioinmunoensayos se llevaron a cabo en un volumen de 1 ml de muestras sin células, con alguno de los controles indicados (DMEM-S o DMEM-S + DMSO) en ausencia de drogas o conteniendo Dex 10 nM o 200 pg de TRH sintética. En la muestra de 200 pg de TRH sintética diluidos en DMEM-S se determinó inmunorreactividad tipo TRH de 393 pg/ml (control: DMEM-S = 0 pg/ml). En el medio DMEM-S + DMSO, 200 pg de TRH sintética reportaron una inmunorreactividad equivalente a 341 pg/ml (control: DMEM-S + DMSO = 22 pg/ml). La presencia de Dex 10 nM parece no interferir con la inmunorreactividad tipo TRH de 200 pg de TRH sintética en DMEM-S + DMSO, que fue de 345 pg/ml (control: DMEM-S + DMSO = 0 pg/ml) (Tabla 1).

Drogas (1 ml; n=3)	Picogramos de TRH (de acuerdo a cpm)
DMEM-S	0
DMEM-S + 200 pg TRH	393
DMSO	22
DMSO + 200 pg TRH	341
DMSO + DEX	0
DMSO + DEX + 200 pg TRH	345

Tabla 1. *Interacción del anticuerpo R2 con medios de cultivo, DEX y TRH sintética.* Se realizó RIA con el anticuerpo R2 específico contra la TRH, a partir de liofilizados de 1 ml de cada una de las siguientes muestras: DMEM-S; DMEM-S + 200 pg TRH sintética; DMEM + DMSO (0.05 % de concentración final de DMSO); DMEM + DMSO (0.05 %) + DEX 10 nM; DMEM + DMSO + DEX 10 nM + 200 pg TRH sintética. La proporción de TRH marcada, no desplazada de su unión al anticuerpo al final del ensayo, se determinó por el número de cuentas por minuto de radioactividad en un contador gamma y se convirtió para expresarlo como pg/ml.

b) Determinación indirecta del procesamiento: Fue de interés conocer si existían precursores almacenados de la TRH como la TRH-gly en las células hipotalámicas en cultivo, o si en nuestras condiciones la TRH provendría solo de síntesis de novo. Dado que el RIA de la TRH-gly se encuentra en proceso de optimización, la determinación de almacenamiento de la TRH-gly se realizó de forma indirecta. La monooxigenasa α -amidante de peptidilglicina (PAM, por sus siglas en inglés) es la enzima responsable de la conversión de la prolin-glicina carboxilo terminal de la TRH a prolina amidada, y por lo tanto su activación incrementa la síntesis del péptido maduro a partir de su precursor inmediato y esta se logra ante la presencia de uno o varios de sus cofactores como ácido ascórbico, cobre o zinc [94, 95]. Se realizaron ensayos en células hipotalámicas fetales de rata mantenidas por 18 DIV con DMEM-S. Al término de este período se retiró todo el medio de cultivo y se sustituyó por 2 ml de alguna de las siguientes diluciones, para incubación durante 24 h: DMEM-S (n=3), DMEM-S + ácido ascórbico 100 μ M (n=3), DMEM/F12-S (medio de cultivo que contiene cobre y zinc) (n=3) y, DMEM/F12 + ácido

ascórbico 100 μ M (n=3). A las 24 h del tratamiento (19 DIV) se separó el medio de las células para análisis de contenido y liberación de la TRH. El ácido ascórbico 100 μ M en DMEM-S produjo un incremento del contenido celular de la TRH de 174 \pm 39 % (1418 \pm 321 pg TRH/mg prot; n=3) en relación al 100 \pm 6 % del control DMEM-S (815 \pm 52 pg TRH/mg prot). No se encontraron diferencias significativas al comparar células incubadas en DMEM/F12-S con 110 \pm 9 % en el contenido celular de TRH (896 \pm 76 pg TRH/mg prot) frente al 100 \pm 6 % de la incubación en DMEM-S (815 \pm 52 pg TRH/mg prot). En contraste el ácido ascórbico 100 μ M en DMEM/F12 muestra un incremento significativo en el contenido celular de la TRH de 231 \pm 58 % (2065 \pm 449 pg TRH/mg prot) frente a DMEM/F12 (896 \pm 76 pg TRH/mg prot), y de 253 \pm 64 % cuando se comparó al DMEM-S (815 \pm 52 pg TRH/mg prot). Los cambios en la liberación de la TRH al medio de cultivo no fueron significativos (Tabla 2).

	CONTENIDO CELULAR		LIBERACION AL MEDIO		TOTAL	
	%	pg TRH/mg prot	%	pg TRH/mg prot	%	pg TRH/mg prot
DMEM-S 24 h (n=3)	100 \pm 6	815 \pm 52	100 \pm 7	1333 \pm 95	100 \pm 6	2148 \pm 118
Acido ascórbico (en DMEM-S) 24 h (n=3)	174 \pm 39	1418 \pm 321	70 \pm 23	936 \pm 300	110 \pm 12	2354 \pm 256
DMEM/F12-S 24 h (n=3)	100 \pm 9 (110 \pm 9 vs DMEM-S)	896 \pm 76	100 \pm 35 (78 \pm 27 vs DMEM-S)	1028 \pm 354	100 \pm 18 (90 \pm 16 vs DMEM-S)	1923 \pm 350
Acido ascórbico (en DMEM/F12-S) 24 h (n=3)	231 \pm 58* (253 \pm 64* vs DMEM-S)	2065 \pm 449	165 \pm 55 (127 \pm 52 vs DMEM-S)	1695 \pm 566	196 \pm 52* (175 \pm 47 vs DMEM-S)	3760 \pm 998

Tabla 2. Efecto del ácido ascórbico y medio de cultivo que contiene cobre y zinc (DMEM/F12) sobre el contenido y liberación de TRH por parte de células hipotalámicas fetales en cultivo. Un cultivo mantenido por 18 DIV se dividió en cuatro grupos de 3 cajas cada uno, a los cuales se le retiró completamente el medio de cultivo y se sustituyó por 2 ml de alguna de las siguientes preparaciones, una para cada grupo: DMEM-S, ácido ascórbico 10 μ M en DMEM-S, DMEM/F12 o ácido ascórbico en DMEM/F12, por un periodo de incubación de 24 h (19 DIV). Se indican los valores de la TRH en pg/mg proteína intracelulares, de liberación al medio durante el tratamiento y la suma de ambos \pm s.e.m. Los valores porcentuales se refieren a la comparación contra los valores de los controles tomados como 100 %. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: *p<0.05.

c) Liberación de la TRH antes y después de tratamiento: Se estudiaron cinco grupos de cultivos de células hipotalámicas en los cuales se midió la cantidad de la TRH que se liberó desde el DIV 16 hasta el DIV 18 cuando se retiró todo el medio de cultivo. Cada grupo se subdividió a su vez en subgrupos de controles y muestras tratadas (Tabla 3). A los platos que se utilizaron como controles se les sustituyó el volumen de medio en que se cultivaron de DIV 16 a DIV 18 por medio fresco (DMEM) y este se mantuvo por periodos de 10, 20, 30, 60 o 120 min. Al final de estos periodos se determinó la

concentración de la TRH intracelular y de la que se liberó a partir del último cambio. La concentración de TRH intracelular expresada en pg/mg de proteína se tomó como el 100 % en cada período y las concentraciones de TRH liberada antes y después del último cambio al DIV 18 se calcularon como una proporción relativa al contenido intracelular (Tabla 3).

TRH liberada DIV 16 a DIV 18			TRH intracelular				TRH liberada el DIV 18 por x minutos		
n	pg/mg proteína	%	minutos con medio fresco	n	pg/mg proteína	%	n	pg/mg proteína	%
128	420±154	52±19	10	23	801±330	100±41	23	164±46	20±6
102	306±124	25±10	20	13	1208±648	100±54	13	136±90	11±7
111	292±89	31±9	30	17	945±288	100±30	17	163±68	17±7
151	397±139	74±26	60	31	537±271	100±51	31	115±27	21±5
56	93±36	47±18	120	14	201±56	100±28	14	96±43	48±21

Tabla 3. *Liberación contra contenido intracelular de TRH.* Se determinó por RIA la concentración de TRH que se liberó desde DIV 16 a DIV 18 en cultivos de células hipotalámicas fetales de rata. De estos grupos se emplearon subgrupos como controles de los tratamientos con drogas y en ellos se determinó tanto la concentración intracelular de TRH la cual se expresa como pg/mg de proteína y se tomó en cada caso como el 100 %, como la liberación al medio fresco durante los tiempos señalados. La concentración de TRH liberada tanto desde DIV 16 hasta DIV 18 como durante los períodos equivalentes a los tiempos de tratamiento ensayados se comparó contra el contenido intracelular para determinar el porcentaje de liberación.

D. Determinación de proteínas

Se hidrolizó la pastilla en 500 µl de NaOH 1N, dejando reposar por 24 horas a temperatura ambiente. Luego se agregaron 500 µl de agua milli-Q y se homogeneizó con la punta de una pipeta. Se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm y se tomaron duplicados de 100 µl los cuales se llevaron a 200 µl con NaOH 0.5N. La curva estándar se preparó con triplicados de tubos conteniendo 5, 10, 20, 40, 60, 80 o 100 µl de BSA (1mg/ml) los que se completaron a 100 µl con agua milli-Q más 100 µl de NaOH 1N. A todos los tubos (curva y muestras) se les añadió 0.9 ml de Solución E (ver apéndice), se agitaron y se dejaron 10 minutos en reposo, posteriormente se agregaron 100 µl de Folin tiocalceus (1:1 con agua milli-Q), se agitaron nuevamente y se dejaron reposar por 30 minutos y luego se leyeron las muestras por espectrofotometría (Espectrofotómetro DU-650; Beckman) a 750 nm [87].

E. Extracción de RNA total

A cada uno de los pozos o cajas de cultivo se les agregó 0.4 ml de solución D mientras se mantuvieron en hielo (ver apéndice), entonces se raspó el fondo con el émbolo de una jeringa y se recuperó la

suspensión resultante en un tubo al cual se añadieron 40 μ l de acetato de sodio 2M, pH 4 y se agitó en vortex. Se adicionaron 400 μ l de fenol saturado con agua y la mezcla volvió a agitarse para recibir posteriormente 80 μ l de cloroformo isoamil-alcohol y agitar en esta ocasión hasta observar el líquido con aspecto lechoso esto fué por aproximadamente 10 segundos, tras de lo cual se mantuvieron todos los tubos 15 minutos en hielo antes de centrifugar. La centrifugación se llevó a cabo por 17 minutos a 13,000 $g/4^{\circ}$ C. Al terminar fueron retiradas las muestras en una gradilla a temperatura ambiente para extraer la fase acuosa y colocarlas posteriormente en hielo, en donde se añadieron 0.45 ml de isopropanol absoluto. Luego se agitaron en vortex y volvieron a centrifugarse por 22 min., a 13,000 $g/4^{\circ}$ C. Se desechó la mayor parte del sobrenadante dejando una cantidad suficiente para cubrir la pastilla y a esta se le agregaron 0.3 ml de solución D mas 0.3 ml de isopropanol absoluto. La muestra fué incubada a -20° C toda la noche. Después de la incubación se agitaron las muestras en vortex para disolver sales. Se centrifugó por 22 min., a 4° C x 13,000 g y al final se desechó todo el sobrenadante salvo una pequeña cantidad que cubriera la pastilla, todo en un solo movimiento, para evitar que hubiera un desprendimiento de la muestra y en seguida se agregaron 400 μ l de etanol al 70 % a cada tubo y nuevamente se centrifugó por 22 min., a 4° C x 13,000 g. Finalmente todo el sobrenadante fue desechado y la pastilla fué mantenida expuesta al ambiente para su desecación. La pastilla seca fué disuelta en un volumen de 15 o 30 μ l de H_2O tridestilada con dietilpirocarbonato (DEPC) según la densidad celular inicial. Se mezcló con la punta de una pipeta y se tomaron 2.5 μ l para diluir en 500 μ l de agua tridestilada estéril y leer por espectrofotometría en 260 nm [88].

F. Transcripción reversa

De acuerdo a la cantidad de RNA total se tomó el volumen necesario de cada muestra para una concentración de 1 μ g y se resuspendió en 12 μ l de H_2O con DEPC. Las muestras se calentaron a 65° C por 5 min e inmediatamente después se depositaron en hielo. La mezcla de reacción para transcripción correspondió a un volumen de 20 μ l por tubo compuesto de: 8.9 μ l de agua bidestilada estéril con DEPC, 6 μ l de buffer RT (reverse transcriptase-BRL) 5X, 3 μ l de DTT 0.1 M 10X, 0.6 μ l (200 μ M) de dNTPs 10 mM, 1 μ l de oligo dT 0.5 μ g/ μ l y 0.5 μ l de transcriptasa reversa (BRL) 200 U/ μ l. Se agitó la mezcla antes de agregar la enzima. Las muestras se incubaron a 37° C durante 2 hrs y al terminar fueron colocadas en hielo para continuar con la PCR, o se almacenaron a -20° C.

G. Reacción de la polimerasa en cadena (PCR)

Se realizó en un volumen final de 50 μ l que estaba compuesto por 6 μ l de cada muestra de la transcripción reversa, mas 44 μ l de la siguiente mezcla de reacción: 33.5 μ l de agua bidestilada estéril, 5 μ l de buffer Taq DNA polimerasa 10 X, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 1 μ l de oligonucleótido TRH3s 100 ng/ μ l y 1 μ l de oligonucleótido TRH4as 100 ng/ μ l L (o 1 μ l de oligonucleótido G3PDH 1s y 1 μ l de oligonucleótido G3PDH 2as para la amplificación de la enzima como control interno). Se agitaron las muestras con sus respectivas mezclas en vortex sin las enzimas, y luego se agregó 0.5 μ l por tubo de la enzima Taq DNA polimerasa 5U/ μ l. A todas las muestras se les protegió de la evaporación cubriéndolas con 50 μ l de aceite mineral. Para iniciar la amplificación durante 30 ciclos en un termociclador programado en una secuencia de 1'15'' a 95°C, 1' a 60°C y 1' a 72°C por ciclo, mas una corrida final de 15' a 72°C. Al terminar se retiró el aceite mineral y se continuó con la electroforesis o se almacenaron las muestras a 4°C.

H. Electroforesis en gel de cDNA de G3PDH y cDNA de pre-pro-TRH

Los productos de PCR fueron separados en geles de agarosa al 2%, para lo cual se tomaron 10 μ l de cada reacción de PCR (TRH y G3PDH) mas 2 μ l de buffer de carga (**ver apéndice**). La electroforesis se llevó a cabo con 100 V. Al terminar la corrida el gel se tiñó con bromuro de etidio por 10 min., se lavó dos veces con agua desionizada y la imagen se capturó por densitometría asistida por computadora en un Multianalizador Fluor-S (BIO-RAD) para su análisis.

I. Análisis estadístico

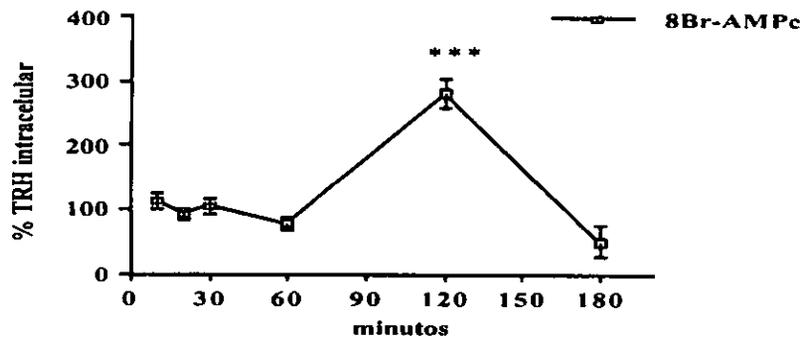
Como prueba estadística se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una comparación múltiple de mínimas diferencias significativas (LSD), considerando significativos valores de $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS

A. Efecto de diversos tratamientos sobre la síntesis de la TRH

1. **Contenido celular de la TRH y liberación al medio.**- El 8Br-AMPC produjo una respuesta rápida, con un incremento significativo en la liberación de la TRH a los 60 min de tratamiento. A los 120 min el aumento en la liberación con respecto al control, se sostuvo bajo el efecto del nucleótido pero además pudo detectarse que este iba acompañado por una elevación igualmente significativa en el contenido celular del neuropéptido. A las tres horas el nivel de la TRH intracelular regreso a valores cercanos al control, no obstante la liberación mantuvo la diferencia estadística observada en las dos horas previas (figura 4).

a)



b)

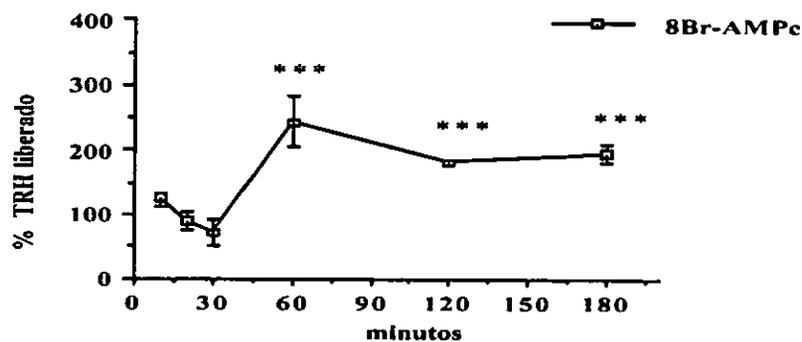
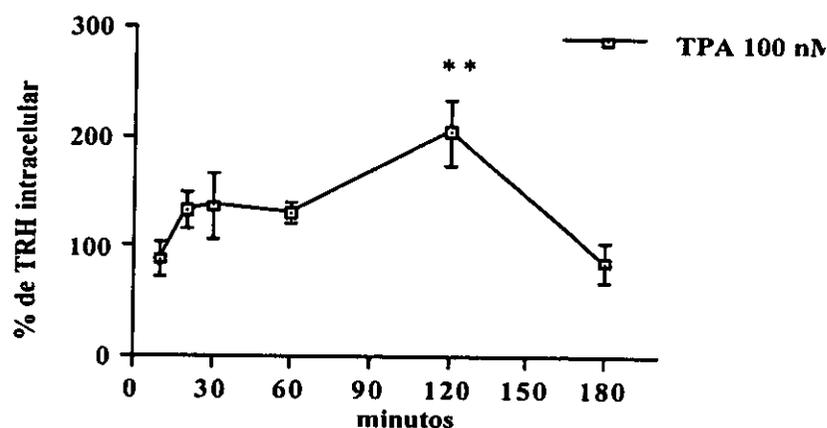


Fig 4. Efecto del 8Br-AMPC sobre el contenido y liberación de TRH por parte de células hipotalámicas fetales en cultivo. Cultivos mantenidos por 18 DIV fueron tratados con 8Br-AMPC 1 mM por 10, 20, 30, 60, 120 y 180 minutos. La concentración de TRH intracelular y liberada se determinó por RIA. a) TRH intracelular: incremento significativo a los 120 min de 279.8 ± 23.3 % [control (n=3): 33.5 ± 2.9 pg TRH/mg proteína. = 100 ± 8.6 %]. b) TRH liberada: incrementos significativos a los 60 min: 243.5 ± 38.6 % [rangos de controles (n=16): 47.8 ± 8.2 a 229.2 ± 74.3 pg TRH/mg proteína = 100 ± 17.4 %]; 120 min: 180.9 ± 4.9 % [control (n=3): 206.4 ± 22.5 pg TRH/mg proteína = 100 ± 11 %] y 180 min: 194 ± 14.9 % [control (n=3): 92.7 ± 16 pg TRH/mg proteína = 100 ± 17]. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: ***p < 0.001 en comparación al control.

De manera semejante a lo ocurrido con la exposición de las células a 8Br-AMPC, el tratamiento con TPA 100 nM por 120 min, produjo en las células hipotalámicas un incremento significativo de aproximadamente dos veces en el nivel intracelular de la TRH. En contraste la liberación no mostró diferencias estadísticamente significativas durante las primeras dos horas pero a los 180 minutos el incremento en el nivel de la TRH respecto al control en el medio de cultivo fue significativo como ocurrió cuando las células fueron expuestas a 8Br-AMPC (figura 5).

a)



b)

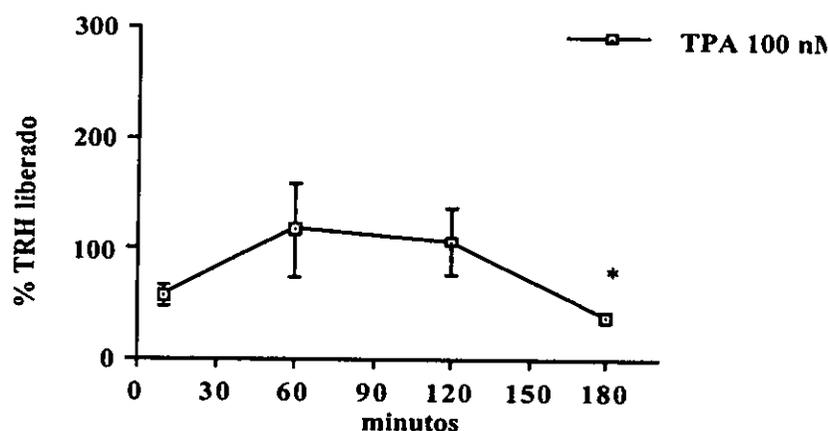
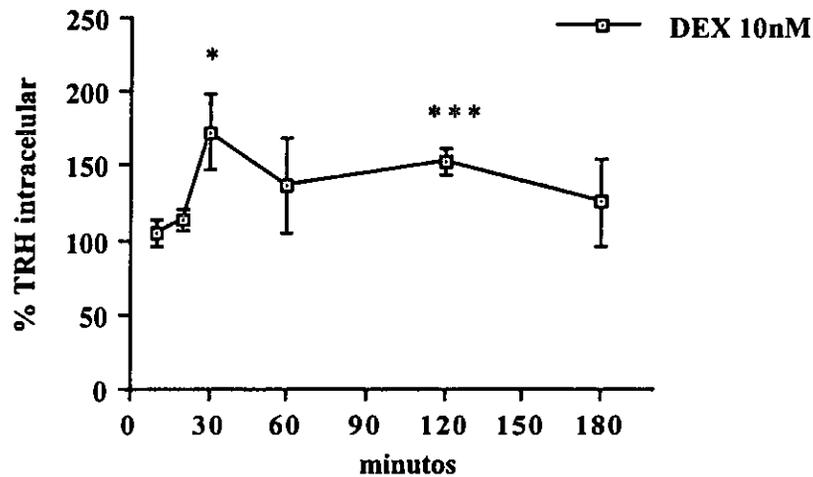


Fig 5. Efecto del TPA 100 nM sobre el contenido y liberación de TRH por parte de células hipotalámicas fetales en cultivo. Cultivos mantenidos por 18 DIV fueron tratados con TPA 100 nM por 10, 20, 30, 60, 120 y 180 minutos. La concentración de TRH intracelular y liberada se determinó por RIA. a) TRH intracelular: incremento significativo a los 120 min de 203.8 ± 31.3 % [control (n=7): $82.5 - 114.5$ pg TRH/mg de proteína. = 100 ± 4.6 %]. b) TRH liberada: disminución significativa de 37.7 ± 2.4 % a los 180 min [Rangos.- control (n=5): $50.9 - 137$ pg TRH/mg de proteína = 100 ± 14.2 %]. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ en comparación al control.

Las neuronas tratadas con dexametasona en dosis 10 nM mostraron incrementos significativos en el nivel de la TRH intracelular a los 30 min (la respuesta más rápida entre los demás tratamientos ensayados en este trabajo), y a los 120 min, semejante a lo que se observó bajo la acción de 8Br-AMPC o TPA en el mismo lapso pero con una magnitud mas discreta. Se produjo incremento en la liberación a los 120 min, que coincidió con el aumento en el contenido celular pero no fué estadísticamente significativo (figura 6).

a)



b)

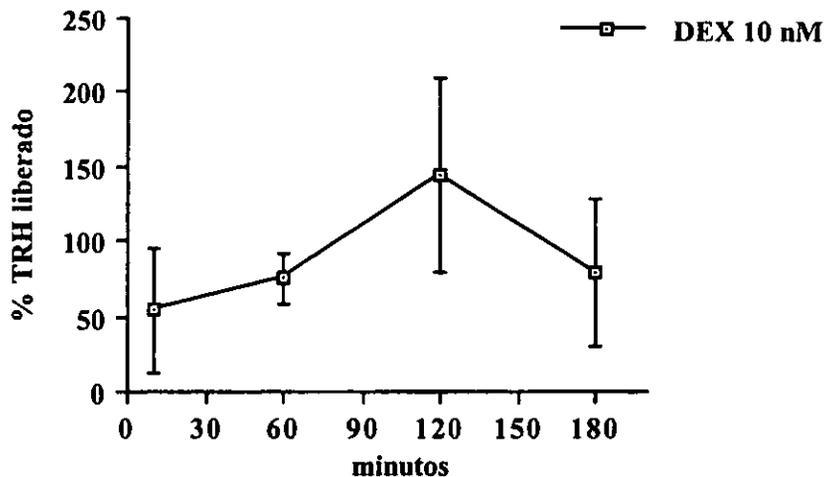
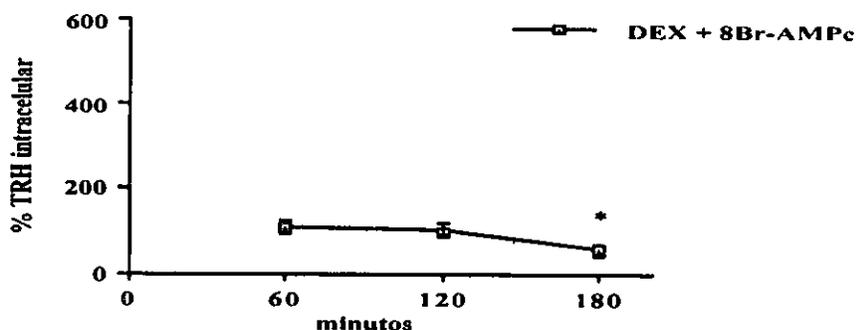


Fig 6. Efecto DEX sobre el contenido y liberación de la TRH por parte de células hipotalámicas fetales en cultivo. Cultivos mantenidos por 18 DIV fueron tratados con DEX 10 nM por 10, 20, 30, 60, 120 y 180 minutos. La concentración de TRH intracelular y liberada se determinó por RIA. a) TRH intracelular: incremento significativo a los 30 minutos de 172.5 ± 26.1 % [Rangos control (n=9): 26.6 - 190.6 pg/mg de proteína = 100 ± 15 %] y a los 120 min, de 152.7 ± 8.3 % [Rangos control (n=7): 82.5 - 114.5 pg/mg de proteína = 100 ± 4.6 %]; b) TRH liberada: no se detectaron cambios significativos en la liberación de TRH al medio de cultivo. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: *p < 0.5 y ***p < 0.001 en comparación al control.

Las evidencias tanto *in vivo* [83] como *in vitro* [86] sugieren que la expresión de mRNA de TRH está sujeta al efecto tanto de segundos mensajeros como de hormonas glucocorticoides, y que puede existir algún tipo de entrecruzamiento entre las señales originadas por ambos tipos de estímulos. Para determinar si la posible comunicación cruzada se manifiesta también en la biosíntesis del péptido, se llevaron a cabo ensayos sobre el contenido y liberación de la TRH en la presencia simultánea de segundos mensajeros y DEX. La presencia simultánea de DEX y 8Br-AMPC produjo una respuesta predominante sobre la liberación de la TRH al medio de cultivo, con un incremento de aproximadamente 4 veces respecto a los niveles del control a los 60 min y de 2 veces a los 120 minutos. El contenido celular de la TRH no mostró cambios aparentes durante estas dos primeras horas. Sin embargo en ambos compartimentos fué evidente que el comportamiento del péptido fué hacia la disminución pues la concentración intracelular reportó un decremento estadístico a los 180 minutos en tanto que la liberación al medio de cultivo regreso a valores semejantes a los del control (figura 7).

a)



b)

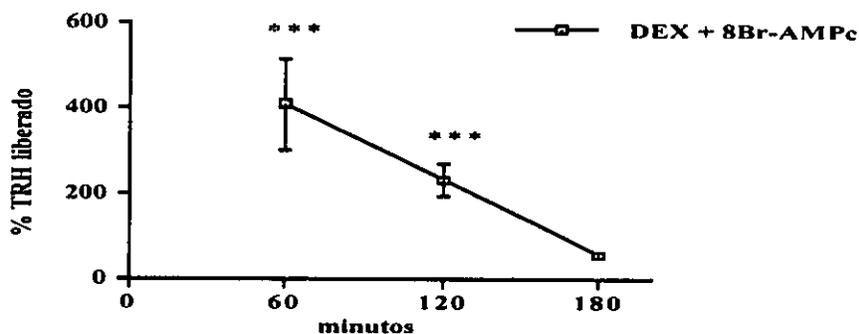
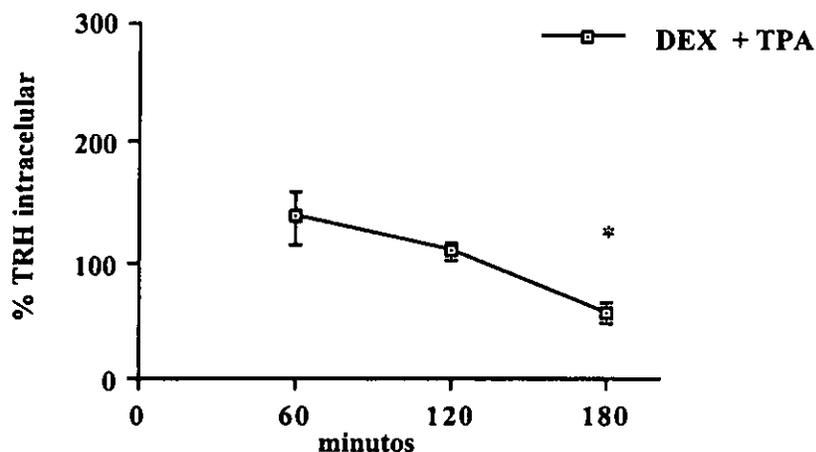


Fig 7. Efecto de DEX en combinación con 8Br-AMPC sobre el contenido y liberación de TRH por parte de células hipotalámicas fetales en cultivo. Cultivos mantenidos por 18 DIV fueron tratados con DEX 10 nM en combinación con 8Br-AMPC 1 mM, por 60, 120 y 180 minutos. La concentración de TRH intracelular y liberada se determinó por RIA. a) TRH intracelular: A los 180 minutos hubo una disminución significativa en el contenido celular de $55.3 \pm 11.5\%$ [Rangos control (n=21): $28.9 - 217.5$ pg/mg de proteína = $100 \pm 8.8\%$], b) TRH liberada: incremento significativo de $406.7 \pm 108.1\%$ [Rangos control (n=5): $33.9 - 195.2$ pg TRH/mg de proteína = $100 \pm 10.1\%$], y 229.5 ± 37 [Rangos control (n=7): $69.7 - 127.2$ pg TRH/mg de proteína = $100 \pm 8.2\%$], a los 60 y 120 min, respectivamente. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: * $p < 0.05$ y *** $p < 0.001$ en comparación al control.

La presencia simultánea de DEX con el éster de forbol TPA mostró un efecto semejante al de la combinación Dex + 8Br-AMPC con respecto a los niveles intracelulares de la TRH que se mantienen cercanos a los controles a los 60 y 120 min. A los 180 minutos se midió una disminución significativa. La liberación se incrementó estadísticamente a los 120 min, y regresó a valores cercanos al control a los 180 min (figura 8).

a)



b)

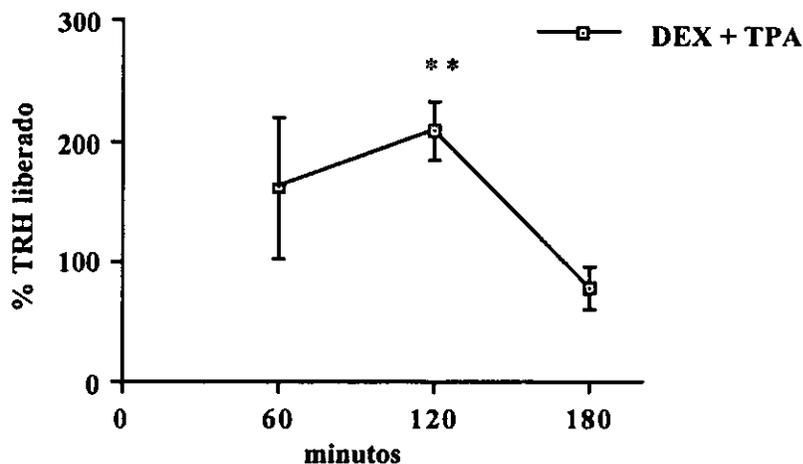


Fig 8. Efecto de DEX en combinación con TPA sobre el contenido y liberación de TRH por parte de células hipotalámicas fetales en cultivo. Cultivos mantenidos por 18 DIV fueron tratados con DEX 10 nM en combinación con TPA 100 nM por 60, 120 y 180 minutos. La concentración de TRH intracelular y liberada se determinó por RIA. a) TRH intracelular: disminución significativa a los 180 min de 55.3 ± 8.7 % [Rangos de control (n=21): 28.9 – 217.5 pg/mg de proteína = 100 ± 8.8]. b) TRH liberada: incremento significativo a los 120 minutos de 207.6 ± 23.9 % [Rangos.- control (n=7): 69.7 – 127.2 pg/mg de proteína = 100 ± 8.2 %]. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ en comparación al control.

2. Cambios en la concentración total de la TRH y su comparación con los niveles del mRNA de la TRH: En este trabajo se estudió el efecto de 8Br-AMPC, TPA y DEX como mediadores potenciales de la regulación de la biosíntesis de la TRH. Las respuestas a tales efectores en la expresión del mRNA de la TRH por el mismo tipo de células y en idénticas condiciones de cultivo y tratamiento, ya se han reportado [86] y constituyen un antecedente directo de esta tesis por lo cual los resultados obtenidos con respecto al péptido se compararon contra los del mensajero. La TRH total (intracelular + liberada al medio) en las neuronas tratadas con 8Br-AMPC mostró incrementos significativos de 160 ± 25 % y 230 ± 25 % a los 60 y 120 min respectivamente. Ambos resultados presentan el mismo comportamiento que el observado para el mRNA el cual incrementa sus niveles hasta 4 veces con respecto al control a los 60 minutos y se mantiene en el mismo promedio una hora después. El paralelismo encontrado se pierde a las 3 hrs, porque el péptido vuelve a niveles normales en tanto que el mensajero incrementa su nivel hasta 5.6 veces cuando se compara con su respectivo control.

El nivel de la TRH celular liberada bajo el tratamiento con DEX presenta un pico de incremento a los 30 minutos de 173 ± 26 % y luego otro a los 120 min de 149 ± 29 % semejante al aumento que ocurre a este tiempo por el tratamiento con TPA, de 155 ± 29 %. Aunque estos dos puntos coinciden en su tendencia con las mediciones análogas del mensajero, la cinética total se comporta de diferente manera pues el mRNA mantiene su incremento a las tres horas y el nivel de la TRH total en cambio regresa a niveles aproximados al control. La dexametasona asociada con 8Br-AMPC muestra una tendencia hacia la inhibición con un incremento significativo a la hora de 280 ± 71 %, el cual disminuye a 165 ± 34 % a las dos horas y a 55.6 ± 25 % a las tres horas, ambos valores significativos respecto al control. Esta cinética es francamente inversa cuando se compara con la cinética que se obtiene con los valores del mensajero con este tratamiento. DEX en combinación con TPA también causa un aumento significativo de 150 ± 32 % en el TRH hipotalámico a los 60 min, el cual se mantiene sin cambios aparentes en promedio a los 120 min, 159 ± 25 % volviéndose sin embargo, menores al control a las tres horas 59 ± 8 %. Las neuronas hipotalámicas en cultivo en presencia de DEX en combinación con 8Br-AMPC y TPA, sugieren una inhibición muy clara a los 60 y 180 min en los niveles del péptido (**Tabla 4**).

a)

	10 min	20 min	30 min
DMEM	100±7.9 (n=25)	100±4.7 (n=14)	100±10.9 (n=14)
8Br-AMPC	117.6±8.4 (n=23)	90.2±7.3 (n=14)	88±12.6 (n=14)

	100±15.2 (n=8)	100±9.1 (n=4)	100±15 (n=9)
DMSO	100±15.2 (n=8)	100±9.1 (n=4)	100±15 (n=9)
DEX	79±22 (n=6)	113.5±7.7 (n=3)	172.5±26.1 (n=7) *
TPA	72.9±11.2 (n=6)	131.4±16.7 (n=3)	136.4±29.4 (n=7)

b)

	60 min		120 min		180 min	
	<i>RNAm TRH</i>	TRH	<i>RNAm TRH</i>	TRH	<i>RNAm TRH</i>	TRH
DMEM	100±5	100±10.6 (n=32)	100±13	100±6.2 (n=6)	100±6	100±4.5 (n=3)
8Br-AMPC	430±23	160.1±24.8 (n=32) *	376±34	230.4±24.5 (n=6) *	567±7	49.6±24.1 (n=3)

DMSO	100	100±6.6 (n=29)	100±13	100±4.5 (n=14)	100±20	100±7.9 (n=26)
DEX	421±75	114.9±19.4 (n=19)	580±68	148.7±29.4 (n=6) *	664±63	117.7±25.2 (n=18)
TPA	102±21	123.4±21 (n=14)	479±16	154.9±29.1 (n=6) *	554±7	76.3±14.2 (n=16)
DEX+AMPC	326±12	280±70.9 (n=19) *	287±7	164.6±34.1 (n=6) *	331±12	55.6±8.7 (n=12) *
DEX+TPA	350±90	150±31.6 (n=13) *	763±82	158.6±24.7 (n=6) *	1264±56	58.4±8 (n=22) *
D+A+T	-----	9.2±9.2 (n=4) *	-----	-----	-----	40±7.7 (n=13) *

Tabla. 4. Comparación entre *RNAm* y concentración total de TRH. Los valores de TRH representan la suma de las concentraciones intracelular y liberada en pg/mg proteína ± s.e.m., y están expresados como porcentaje ± s.e.m., respecto al control respectivo (DMEM o DMSO) tomado como el 100%. a) Cambios en el TRH total durante 10, 20 y 30 min; b) Cambios en el TRH total a los 60, 120 y 180 min y su comparación con los cambios reportados por Pérez Martínez et al, 1998 [87] en el *RNAm* (en *italicas*) bajo los mismos tiempos y tratamientos.

3. Efecto de dexametasona en ausencia de síntesis de proteínas: Existe el antecedente de que el efecto de DEX durante 1 hora en cultivos de células hipotalámicas se manifiesta como un incremento en los niveles de *RNAm* de TRH [86] y en el presente trabajo dicho tratamiento produjo un aumento del contenido de TRH a los 30 min, en las mismas condiciones de cultivo. Se ha reportado que la presencia de DEX por 7 días induce una elevación en los niveles de mRNA de la TRH, c-fos y c-jun en neuronas diencefálicas en cultivo [96]. El bloqueo de la expresión de CREB por medio de oligos antisentido anula en este caso el incremento de los mensajeros de c-fos y c-jun. Estos datos sugieren que la DEX requiere a mediano plazo la síntesis de factores de transcripción como FOS o JUN para producir un efecto sobre la expresión del gen de la TRH y que CREB es un intermediario en la acción del glucocorticoide [97]. Con el fin de determinar si la DEX requiere de síntesis de proteínas para producir efectos en la expresión del mRNA de la TRH en periodos breves, se trataron grupos de células con CHX para inhibir la síntesis de proteínas en ausencia y presencia de DEX y 8Br-AMPC. Estos ensayos

demostraron que la preincubación con CHX no produce ninguna diferencia en los niveles de mRNA de la TRH cuando se comparan a los controles. Por otra parte, el incremento del mRNA de la TRH que se observa cuando se trata a las células con DEX por 1 hora, no se modifica si antes se ha inhibido la síntesis protéica con CHX. Los incrementos que se observan en el mRNA de la TRH bajo la acción de DEX u 8Br-AMPC se anulan e inclusive existe una tendencia a la inhibición cuando se asocian las dos drogas. La preincubación en presencia de CHX contrarresta la inhibición en los niveles del mRNA de la TRH que se produce por efecto de la asociación de DEX + 8Br-AMPC (Tabla 5).

Tratamiento	Promedio %
[DMSO (90 min)]	100±7
[DMSO + CHX (90 min)]	100±4
[DMEM (30 min)] + [DEX (60 min)]	171±7
[DMEM + CHX (30 min)] + [DEX (60 min)]	154±8
[DMEM (30 min)] + [DEX + 8Br-AMPC (60 min)]	80±5
[DMEM +CHX (30 min)] + [DEX + 8BrAMPc (60 min)]	127±5

Tabla. 5. Efecto de cicloheximida (CHX), dexametasona (DEX) y 8Br-AMPC en la expresión de RNAm de TRH. Cultivos hipotalámicos mantenidos por 18 DIV fueron tratados por la primera droga o combinación encerrada en corchetes por el tiempo señalado en el paréntesis. Al término de dicho tiempo se añadió la droga o combinación encerrada en el siguiente corchete por el tiempo adicional indicado y sin retirar el primer tratamiento. Cuando se trató a las células con CHX y alguna otra droga, la primera se agregó 30 min antes. Los niveles de mRNA de TRH se determinaron por RT-PCR usando la enzima G3PDH como control interno. Las imágenes de los productos de PCR en geles teñidos con bromuro de etidio fueron capturadas por densitometría asistida por computadora (Multianalizador Fluor-S, Bio Rad) en U.A y se registraron como cambios porcentuales respecto al control (DMSO=0.613 ± 0.04 U.A = 100 ± 7 %). DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium. DMSO: dimetilsulfóxido.

B. Efecto de la presencia de hormonas tiroideas por tiempos cortos sobre la expresión del mRNA de la TRH.

Se realizaron ensayos para determinar el efecto de las hormonas tiroideas sobre la síntesis neuronal de mRNA de la TRH durante períodos breves de tiempo y su relación con algunos de los posibles reguladores de la biosíntesis de la TRH. En nuestras condiciones de cultivo, la única fuente de hormona tiroidea proviene del suero bovino fetal que proporciona una concentración final de T₄ por plato o pozo, de 20 nM. Tampoco existe información sobre la cantidad que esto produzca de T₃ que es la

forma más activa de la hormona. En el humano la concentración de T_4 total es alrededor de 100 nM en el eutiroidismo en tanto que T_4 y T_3 libres en plasma tienen concentraciones de 0.03 y 0.02 nM respectivamente [98] y en la rata la concentración plasmática media de T_3 requerida para suprimir el mRNA de la pro-TRH en hipotálamo a niveles eutiroides es de 110.3 ng/dL, similar a lo que se requiere para suprimir la secreción de la TSH de la pituitaria anterior esto es 108.7 ng/dL o 2 nM [99]. Diversos trabajos que estudian efectos de T_3 sobre cultivos neuronales emplean las concentraciones 1 o 10 nM [100, 101, 102]. Tomando en cuenta estos datos se realizó primero una curva dosis-respuesta a T_3 por 24 horas, en un rango de dosis que fueron desde 0.01 nM hasta 10 μ M inclusive, ante la duda de la concentración fisiológica de T_3 libre, es decir disponible para tener un efecto en las células hipotálamicas de la rata. Se observó primero una inhibición con la dosis 0.01 nM y luego dos fases de incrementos progresivos la primera desde 0.1 nM hasta 10 nM en el mRNA de la TRH interrumpida con la dosis 100 nM cuando los valores del mensajero vuelven a niveles cercanos a los controles y una segunda fase con las concentraciones 1 y 10 μ M (figura 9).

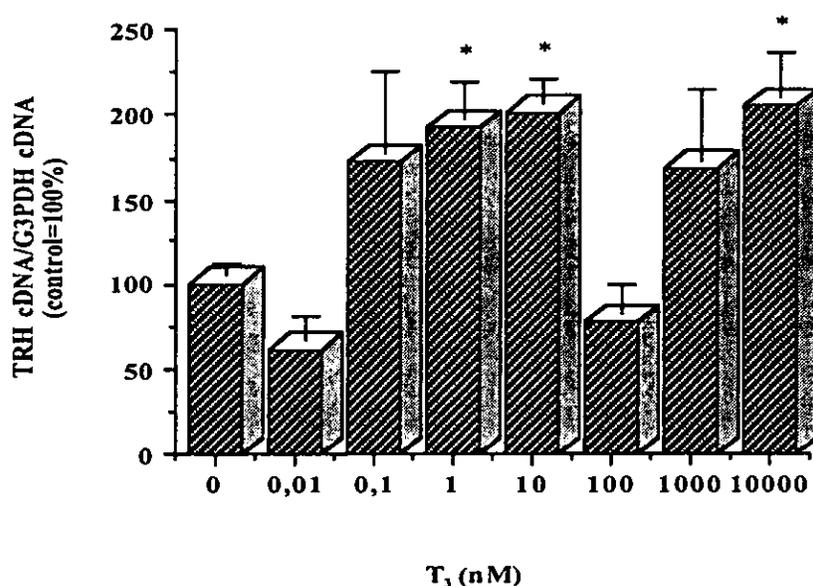


Fig. 9. Efecto dosis-respuesta de triiodotironina (T_3) sobre la expresión de mRNA de TRH. Células hipotálamicas fetales cultivadas durante 18 días y después tratadas con diferentes dosis de T_3 durante 24 h. Los niveles de mRNA de TRH fueron determinados por RT-PCR usando a la enzima G3PDH como control interno. Las imágenes de los productos de PCR en geles teñidos con bromuro de etidio se capturaron por densitometría asistida por computadora (Multianalizador-Fluor-S, Bio-Rad) en U.A. y se graficaron como cambios porcentuales respecto al control (0 nM $T_3 = 0.21 \pm 0.01$ U.A., tomado como el 100 %). Cada barra representa el promedio \pm s.e.m (3 platos por cada una). Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: * $p < 0.05$ comparado al control.

La cantidad de cDNA de TRH obtenida por RT-PCR fue corregida con los valores del cDNA de G3PDH, encontrándose las diferencias descritas; no obstante dicha enzima no resulta un control interno idóneo debido a que su comportamiento es similar al observado para el RNA de la TRH con incrementos significativos respecto al control en los grupos tratados con las concentraciones 1, 10 nM y 1 μ M aunque de modo más discreto.

Después se realizó otra curva dosis-respuesta con el fin de determinar si las hormonas tiroideas tienen la capacidad de afectar la expresión del mRNA de la TRH en períodos breves de tiempo. Se decidió que el período de tratamiento fuese de 3 horas, tomando en cuenta que este fué el mayor lapso dentro del rango de tiempos que en este trabajo hemos considerado como cortos: 30, 60, 120 y 180 min, con lo que sería teóricamente mas factible que una mayor cantidad de hormona se transportara al interior del núcleo con respecto a los períodos mas breves. Además sería posible también la comparación de estos resultados con aquellos observados con otros estímulos a tiempos semejantes. La respuesta obtenida con este ensayo fué un incremento significativo con la dosis 1 nM que se mantuvo hasta la dosis 1 μ M inclusive. Con la concentración 10 μ M los niveles de mRNA de la TRH regresaron a valores cercanos al control. La cantidad de cDNA de TRH obtenida por RT-PCR fue corregida con los valores del cDNA de G3PDH (figura 10).

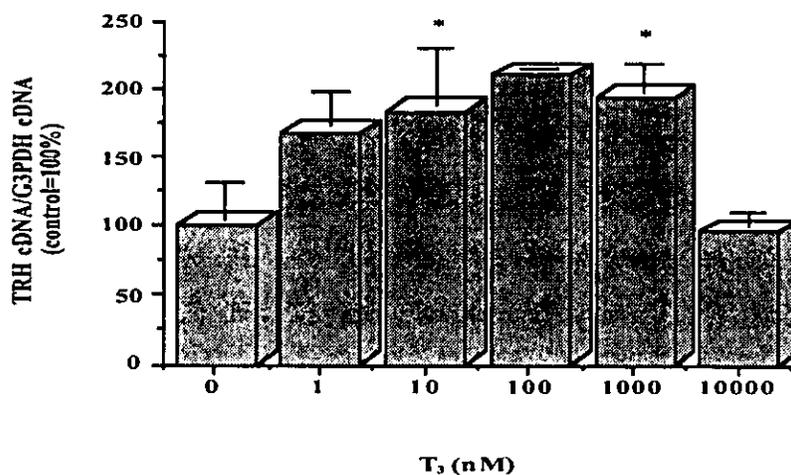


Fig.10. Efecto dependiente de la dosis de triiodotironina (T_3) sobre la expresión de mRNA de TRH. Células hipotalámicas fetales cultivadas durante 18 días y después tratadas con diferentes dosis de T_3 durante 3 h. Los niveles de mRNA de TRH fueron determinados por RT-PCR usando a la enzima G3PDH como control interno. Las imágenes de los productos de PCR en geles teñidos con bromuro de etidio se capturaron por densitometría asistida por computadora (Multianalizador-Fluor-S, Bio-Rad) en U.A. y se graficaron como cambios porcentuales respecto al control (0 nM T_3 = 0.25 ± 0.06 U.A., tomado como el 100%). Cada barra representa el promedio \pm s.e.m. (3 platos por cada una, excepto 100 nM n=2). Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: * $p < 0.05$ comparado al control.

La concentración de T_3 1 nM se aproxima a los valores considerados necesarios para mantener el eutiroidismo en rata [103], y además fue suficiente para observar una respuesta rápida significativa en la expresión del mRNA de la TRH. Por lo tanto se empleó tal dosis como suplemento del medio de cultivo con el que se sembraron y mantuvieron células hipotalámicas fetales de rata durante 14 días. El objetivo fue el de evaluar el estado de las células al final del cultivo con relación a la síntesis de mRNA de la TRH puesto que no se sabe si hay conversión de la T_4 que proporciona el SBF, y si lo hay, si este es suficiente para mantener un cultivo en condiciones eutiroides. El tratamiento con hormona tiroidea se comparó con un control mantenido con DMEM + DMSO, con un grupo tratado con corticosterona en dosis de 100 nM y con otro grupo en el cual se asociaron a las dos hormonas en las dosis descritas. No se observaron diferencias significativas en los niveles de mRNA de la TRH entre los grupos de tratamiento (figura 11).

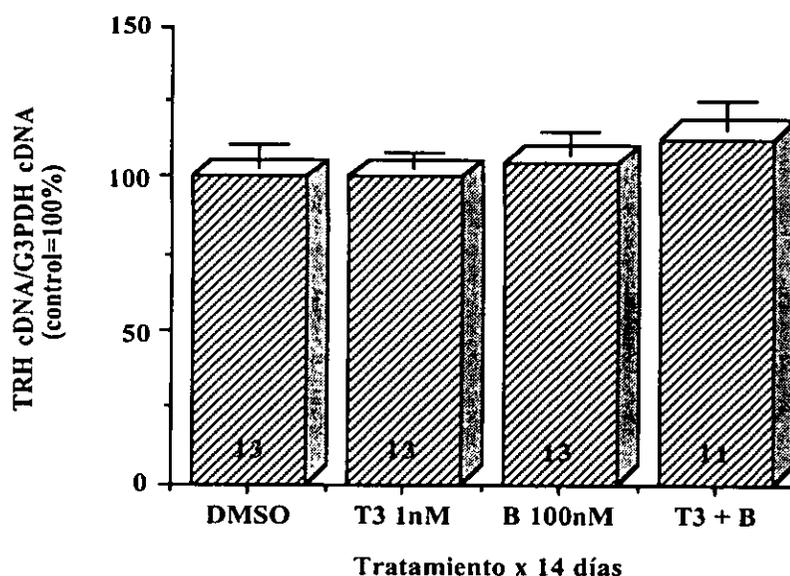


Fig.11. Efecto de triiodotironina (T_3) y corticosterona (B) sobre los niveles de mRNA de TRH. Cultivos hipotalámicos mantenidos por 14 DI V con alguno de los siguientes tratamientos: T_3 1 nM o corticosterona 100 nM o la combinación de ambas a las mismas concentraciones. El mRNA de TRH se determinó por RT-PCR usando a la enzima G3PDH como control interno. Las imágenes de los productos de PCR en geles teñidos con bromuro de etidio fueron capturadas por densitometría asistida por computadora (Multianalizador-Fluor-S, Bio-Rad) en U.A., y se graficaron como cambios porcentuales respecto al control (DMSO=100±8.4 %). Cada barra representa el promedio ± s.e.m.(el número dentro de la barra indica la suma de los platos de dos cultivos, por grupos de tratamiento). Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD.

Los resultados anteriores sugirieron que la síntesis de mRNA de la TRH, aparentemente no se alteró con la presencia a largo plazo de hormonas tiroideas a una concentración de T_3 1 nM. La siguiente pregunta fue relativa a saber si estas condiciones de cultivo modificaban la capacidad de respuesta de las células frente a estímulos agudos al compararlas a las respuestas de las células cultivadas en nuestras condiciones habituales. Para responder a dicha pregunta se mantuvieron dos grupos de cultivo, uno de ellos con medio suplementado con DMSO y el segundo con T_3 en la dosis 1 nM. Al DIV 18 se dividió cada grupo en 4 subgrupos que se trataron a su vez durante una hora con DMSO, DEX 10 nM, Corticosterona 100 nM o T_3 1nM respectivamente. Se extrajo el RNA para RT-PCR o se realizó inmunocitoquímica. La respuesta del mRNA de la TRH indica que los estímulos agudos aplicados incrementan su expresión significativa en ambos grupos de cultivo, sin embargo permiten observar también que esta expresión es mayor en el grupo cultivado con hormona tiroidea. Además que la T_3 actuando como efector a corto plazo tiene la capacidad de influir sobre los niveles del mensajero de la TRH (figura 12).

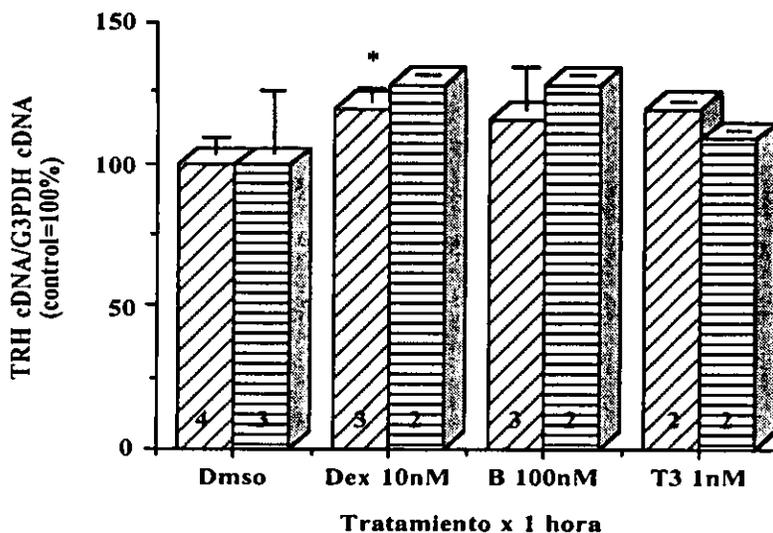


Fig.12. Efecto de Dexametasona (Dex), Corticosterona (B), o Triiodotironina (T_3) sobre los niveles de mRNA de TRH. En un cultivo de células hipotalámicas fetales de rata se mantuvieron dos grupos por 14 días: con DMSO (diagonales) o con T_3 1nM (horizontales). El DIV 14 cada grupo se dividió en 4 subgrupos a los cuales se les sustituyó el medio condicionado por alguna de las siguientes drogas que se mantuvieron por 1 h: DMSO como control, Dex 10 nM, B 100 nM o T_3 1. Los niveles de mRNA de TRH se determinaron por RT-PCR usando a la enzima G3PDH como control interno. Las imágenes de los productos de PCR en geles teñidos con bromuro de etidio fueron capturadas por densitometría asistida por computadora (Multianalizador-Fluor S, Bio-Rad) en U. A. y se graficaron como cambios porcentuales respecto al control, tomado como el 100 %. Cada barra representa su promedio \pm s.e.m. Análisis estadístico por ANOVA seguido por una comparación LSD: * $p < 0.05$

VIII. DISCUSION

Un estímulo físico genera en un organismo la transmisión de una señal desde la piel hasta el sistema nervioso central, en cuestión de segundos. Independientemente de si este estímulo llega a la corteza y si es consciente o no (fundamentalmente en el humano), proporciona información hacia diversas regiones del encéfalo que controlan funciones vegetativas [104] como lo ejemplifica la transmisión de información térmica desde la piel hasta el tálamo e hipotálamo a través del tallo encefálico [33]. El frío produce un incremento en el mRNA de la TRH en el NPV a los 30 minutos de iniciado el estímulo, y a los 5 minutos un incremento de corticosterona en el suero, del 45 % con respecto a los niveles basales [83]. Si la elevación del nivel plasmático del glucocorticoide es consecuencia del efecto simpático sobre las glándulas suprarrenales, o de la acción de la ACTH liberada a la circulación por la adenohipófisis en respuesta a un estímulo hipotalámico aún no es claro, pero de acuerdo a sus facultades como regulador de la biosíntesis de TRH origina preguntas relativas a su participación en respuestas agudas a un estímulo y a su interacción con las vías activadas por la neurotransmisión.

En este trabajo se estudiaron en un modelo *in vitro* fenómenos potencialmente involucrados en la regulación tanto neural como hormonal de la biosíntesis de la TRH. Para ello se realizaron ensayos con ciertos factores que llegan a presentar cambios paralelos a la activación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas como son las vías de activación de PKA, PKC, las hormonas glucocorticoideas y las tiroideas.

La respuesta de los niveles de TRH a 8Br-AMPC y TPA sugiere que como elementos de las cascadas de señalización iniciadas por estas drogas, tanto PKA como PKC participan en la regulación de la biosíntesis de TRH [47], tomando además en cuenta la presencia en el promotor del gen de la TRH de al menos dos secuencias imperfectas que unen a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMPC (CREB; por sus siglas en inglés) así como a AP-1 a -101 y -59 pb respectivamente [25, 26]. En un sistema neuroendocrino análogo al de la TRH como es el adrenal, la fosforilación de CREB en respuesta a la acción de PKA ha sido demostrada como un fenómeno rápido (aproximadamente 5 min) paralelo a la síntesis de RNA heterogéneo nuclear de la hormona liberadora de corticotropina (CRH, por sus siglas en inglés) en neuronas neurosecretoras parvocelulares [105]. Por otra parte, CREB es un factor necesario para la expresión de mRNA de CRH y liberación de la CRH en hipotálamo, así como para la expresión de mRNA de POMC y liberación de ACTH en la adenohipófisis en un periodo de aproximadamente 30 min [106]. Estos datos apoyan la idea de que la rapidez del incremento de la TRH

en neuronas tratadas con 8Br-AMPC, depende de la acción de CREB sobre la expresión del gen y la biosíntesis del péptido. No obstante aún no se cuenta con una evidencia clara respecto a que la TRH detectada, en efecto provenga de la traducción del mensajero recién sintetizado y cabe la posibilidad de que también se active algún paso en el procesamiento. En este sentido se ha identificado una secuencia CRE en el promotor del gen de la convertasa PC2, una de las enzimas encargadas de cortar a la pro-TRH en los pares de aminoácidos básicos que flanquean las secuencias de TRH [107], aunque tampoco existen referencias de una regulación directa por parte de las vías activadas por AMPc, sobre esta o alguna otra enzima de procesamiento.

El incremento de la TRH que se observa a los 60 minutos con 8Br-AMPC se manifiesta solamente como liberación al medio de cultivo. En modelos de estudio semejantes, como es la liberación del péptido relacionado al gen de calcitonina en cultivos primarios de ganglios de las raíces dorsales de rata adulta, se ha considerado a la liberación que se presenta en respuesta a db-AMPC, como un proceso que se produce en forma no regulada como reflejo de la síntesis del péptido y a su vez esta como una simple consecuencia del incremento en la expresión del mensajero. Sin embargo, las vías de señalización intracelular dependientes de AMPc (principalmente PKA) han sido implicadas también en otros fenómenos distintos a la regulación de la expresión génica tales como: secuestro de Ca^{2+} en almacenes sensibles a taspigargina [108], oscilaciones de calcio en melanotropos [109], incremento de la utilización de canales de calcio en músculo [110], liberación de hormona de crecimiento [111], exocitosis de amilasa de acinos pancreáticos [112], inhibición de la liberación de fosfatasa alcalina de células osteoblásticas humanas [113], liberación de NPY de células fetales cerebrales en cultivo [114], etc., lo que hace candidato al AMPc como un factor capaz de producir por si mismo liberación de otros neuropéptidos (en este caso TRH) al permitir la entrada del calcio extracelular, mediante la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que produciría una agregación de las vesículas de almacenamiento, su unión a la membrana plasmática de la terminal axónica y la liberación del contenido, independientemente del efecto que tenga sobre la expresión de los genes o sobre los niveles del mensajero. El aumento en el contenido celular detectado a los 120 minutos hace suponer que a este tiempo el nivel del péptido si es un reflejo de la expresión del mensajero (que también se encuentra incrementado en este momento [86]) y su traducción, manteniéndose el efecto secretorio del 8Br-AMPC sobre la TRH.

El retorno de la TRH intracelular a niveles semejantes a los del control podría entenderse entonces como el resultado de la acción del nucleótido como secretagogo mantenida hasta los 180 minutos, independientemente de si en este momento hay incremento de la traducción o del procesamiento. No obstante, el nivel de la TRH en el medio de cultivo en este tiempo no indicó secreción reciente. La idea de una inhibición potencial de la biosíntesis (represión de la expresión génica, disminución en la vida media del mRNA, inactivación de las enzimas de procesamiento) producida por 8Br-AMPC no explica suficientemente la disminución en el nivel de la TRH, porque al menos debería observarse la acumulación del péptido en el medio durante las dos hora previas. La hipótesis en este caso, de degradación de la TRH en el medio de cultivo, se ve apoyada por el hecho de que se ha identificado actividad tipo PPII en fracciones membranales de células hipotalámicas o corticales en cultivos de cerebro fetal de ratón en los cuales se ha suprimido la proliferación de células no neuronales [115] (figura 13).

Con el TPA se produjo un incremento de la TRH a las 2 horas de tratamiento. En las mismas condiciones de cultivo y tratamiento se ha reportado también incremento del mRNA de la TRH [86]. En ningún caso se detectó liberación al medio de cultivo, mas aún, a los 180 minutos se produjo una disminución significativa en la TRH liberada que aparentemente solo se explicaría por degradación del péptido en el medio de cultivo por parte de la PPII. Estos datos contrastan con lo que ocurre en un ensayo en el cual se inyecta TPA en el PVN para determinar los cambios en el sistema adrenal. En este caso no hay efecto sobre el mRNA de la CRH y si en cambio existe liberación de la CRH hipotalámica [105], indicando que no obstante lo semejante que sean el eje adrenal y el tiroideo cuentan con mecanismos de regulación que pueden ser inclusive opuestos, o por otra parte que la discrepancia es producto de la comparación de un sistema *in vivo* y uno *in vitro*. Cualquier respuesta a un ester de forbol como TPA, como activador artificial de PKC solo nos habla de que esta cinasa está involucrada en el proceso estudiado sin embargo la diversidad de sus efectos no permite con estos resultados establecer un mecanismo de acción posible. Las PKC son una familia de 12 isoformas de proteínas de mamíferos y en términos generales fosforilan otras cinasas e inician cascadas de señalización hacia el núcleo, fosforilan proteínas citoplásmicas de anclaje, o directamente fosforilan proteínas que son directamente translocadas al núcleo, sin embargo, tal vez un proceso más involucrado en la regulación de biosíntesis de neuropéptidos como la TRH sea el estudiado con otro ester de forbol como PMA o

briostatina los cuales tienen la capacidad de translocar a PKC al núcleo en donde estimularían la expresión de los genes c-fos o c-jun cuyos productos protéicos pueden formar homo- o heterodímeros (JUN/JUN o JUN/FOS) llamados genéricamente AP-1 y unirse a secuencias TRE en los promotores de diversos genes [116] (figura 14).

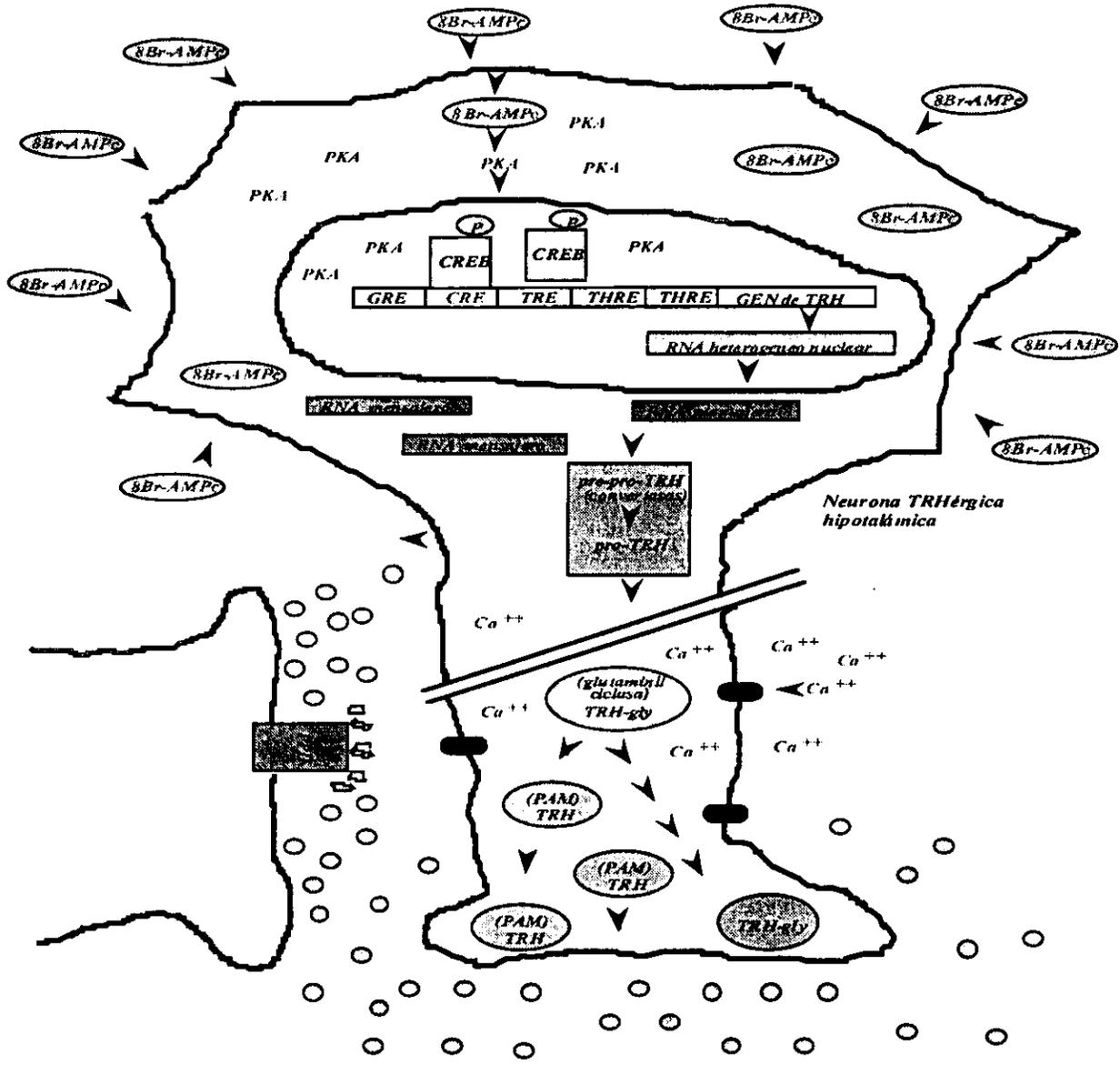


Fig. 13. Efecto propuesto del 8 Br - AMPC sobre la síntesis hipotálamica de la TRH. El 8Br-AMPC que ingresa a las células activa en el citosol a la proteína cinasa A (PKA) la cual ingresa al núcleo y fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (CREB). CREB fosforilada se une al elemento de respuesta al AMP cíclico (CRE) en el promotor del gen de TRH activando la transcripción del gen de TRH lo que se refleja en el incremento en los niveles de mRNA de TRH y del péptido intracelular. Un aumento en la estabilidad del mensajero es una explicación alternativa del incremento en su expresión. Otro mecanismo propuesto que no excluiría al anterior es un efecto de incremento en la entrada de calcio (Ca⁺⁺) al activar canales de calcio dependientes de voltaje en la terminal axónica. El calcio produce agregación de vesículas de almacenamiento en este caso de TRH, su unión a la membrana presináptica y la liberación de su contenido, que puede ser la TRH madura o su precursor inmediato TRH-gly.

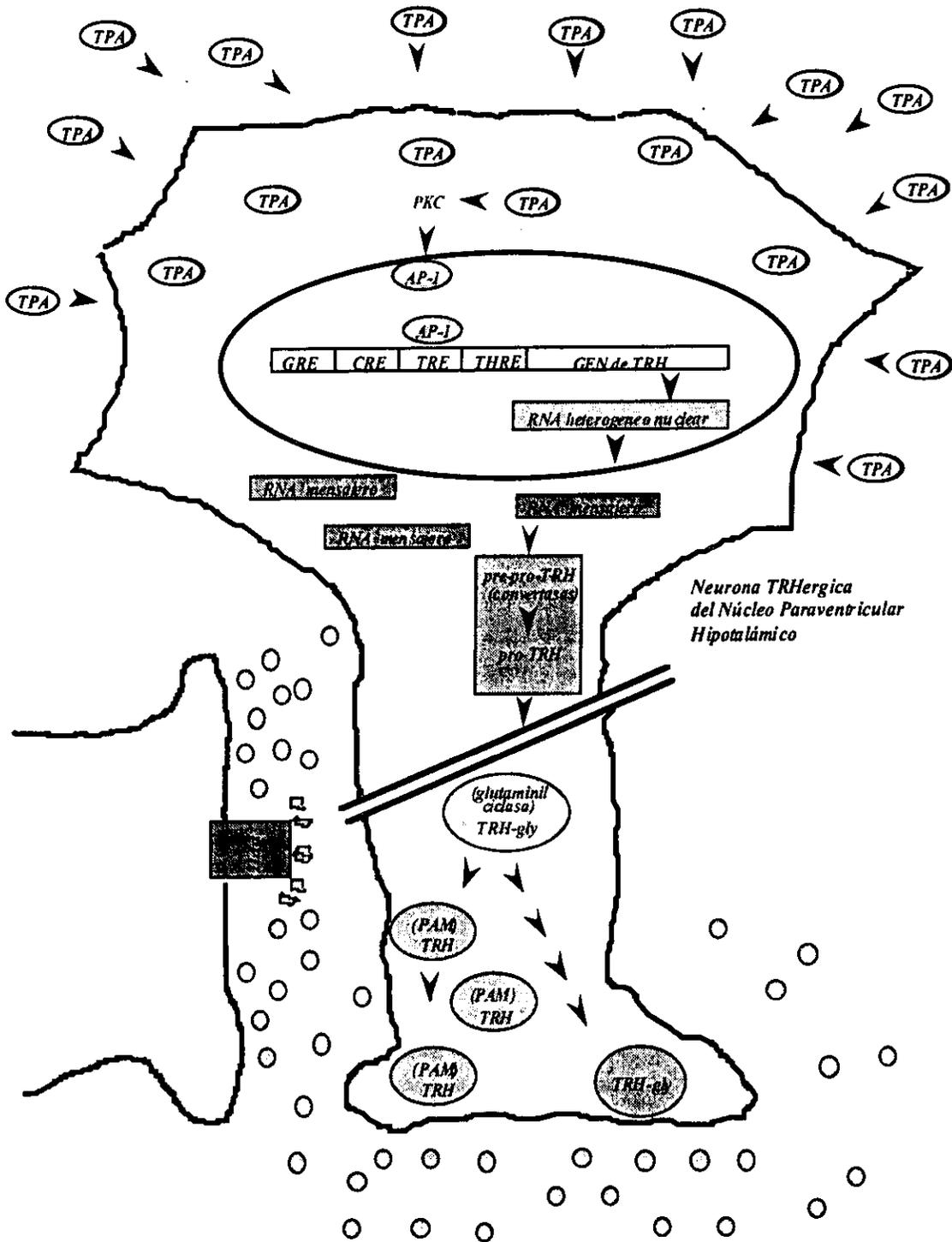


Fig. 14. Efecto propuesto de TPA sobre neuronas TRHérgicas. El TPA que ingresa a las células activa en el citosol a la proteína cinasa C (PKC) la cual ingresa al núcleo y estimula la expresión de los genes c-fos y/o c-jun dando lugar a la síntesis de las proteínas FOS y JUN y en consecuencia del dímero AP-1. AP-1 se une al elemento de respuesta al TPA (TRE) en el promotor del gen de la TRH, activando la transcripción del gen de TRH lo que se refleja en el incremento en los niveles de mRNA de TRH y del péptido intracelular. Una explicación alternativa en el aumento en la expresión del mRNA de la TRH es un incremento en su estabilidad. No hay evidencias en este caso de efectos sobre la liberación del péptido.

El nivel de la TRH intracelular sufrió un incremento significativo a los 30 minutos de tratar a las neuronas hipotalámicas en cultivo, con dexametasona. Esta velocidad de respuesta no es compatible con el mecanismo conocido de acción de los glucocorticoides sobre la regulación de la expresión génica. Los efectos de dexametasona sobre la transcripción del gen de TRH, el mRNA de la TRH o sobre el péptido mismo se han estudiado tanto *in vivo* [73] como *in vitro* [81] en períodos de por lo menos 2 días de tratamiento con el esteroide, implicando la entrada de la hormona a la célula, su unión al receptor citoplásmico, la traslocación al núcleo, la unión a un elemento de respuesta en el promotor del gen y la activación o represión en la expresión dicho gen [117]. Por lo tanto una explicación alternativa debe considerar la posibilidad de que las hormonas glucocorticoides afecten el metabolismo celular en niveles diferentes al transcripcional. Como ejemplo, la dexametasona tiene un efecto directo sobre la liberación de somatostatina tanto *in vivo* como *in vitro* [118]. Además hay suficiente evidencia sobre la presencia y función de receptores membranales a glucocorticoides en cerebro [119; 120; 121; 122; 123; 124; 125; 126] lo que apoyaría la explicación sobre un efecto rápido mediado por cascadas de señalización intracelular que involucren segundos y terceros mensajeros como sucede con efectores peptídicos. De ocurrir así, es más factible pensar que la TRH detectada tuviera su origen a partir de precursores almacenados y no en síntesis *de novo*. Se han descrito diversas funciones de dexametasona en el procesamiento de neuropéptidos, por ejemplo, se ha observado correulación del mRNA de la convertasa PC1, y los mRNA de la POMC y la PAM en respuesta a la CRH y glucocorticoides. Por otra parte se ha demostrado *in vivo* que la dexametasona en un lapso de 1 a 4 horas disminuye la TRH-gly hipotalámica y que este fenómeno se acompaña de un incremento en nivel de la TRH intracelular, y aunque estos cambios han intentado ser explicados como una inhibición de la síntesis y de la secreción no pueden descartarse efectos sobre el último paso del procesamiento desde la TRH-gly a la TRH madura [127]. En el largo plazo por el contrario no se ha observado algún efecto de los glucocorticoides sobre el nivel de la TRH-gly y la α -amidación [71, 86].

El incremento en la TRH intracelular a los 120 minutos sigue siendo un efecto rápido pero cuenta con el antecedente de un incremento en mRNA, por lo que podría ser explicado por un aumento en la traducción [86] (figura 15).

El efecto de la asociación de DEX + 8Br-AMPC es aparentemente sinérgico sobre los niveles de la TRH total durante los primeros 60 minutos de tratamiento, aunque predominando el aspecto secretor de 8Br-AMPC. El comportamiento del péptido en las siguientes dos horas puede interpretarse de dos

maneras: como inhibición en la síntesis de la TRH y/o mantenimiento de la secreción del péptido además de su degradación en el medio de cultivo.

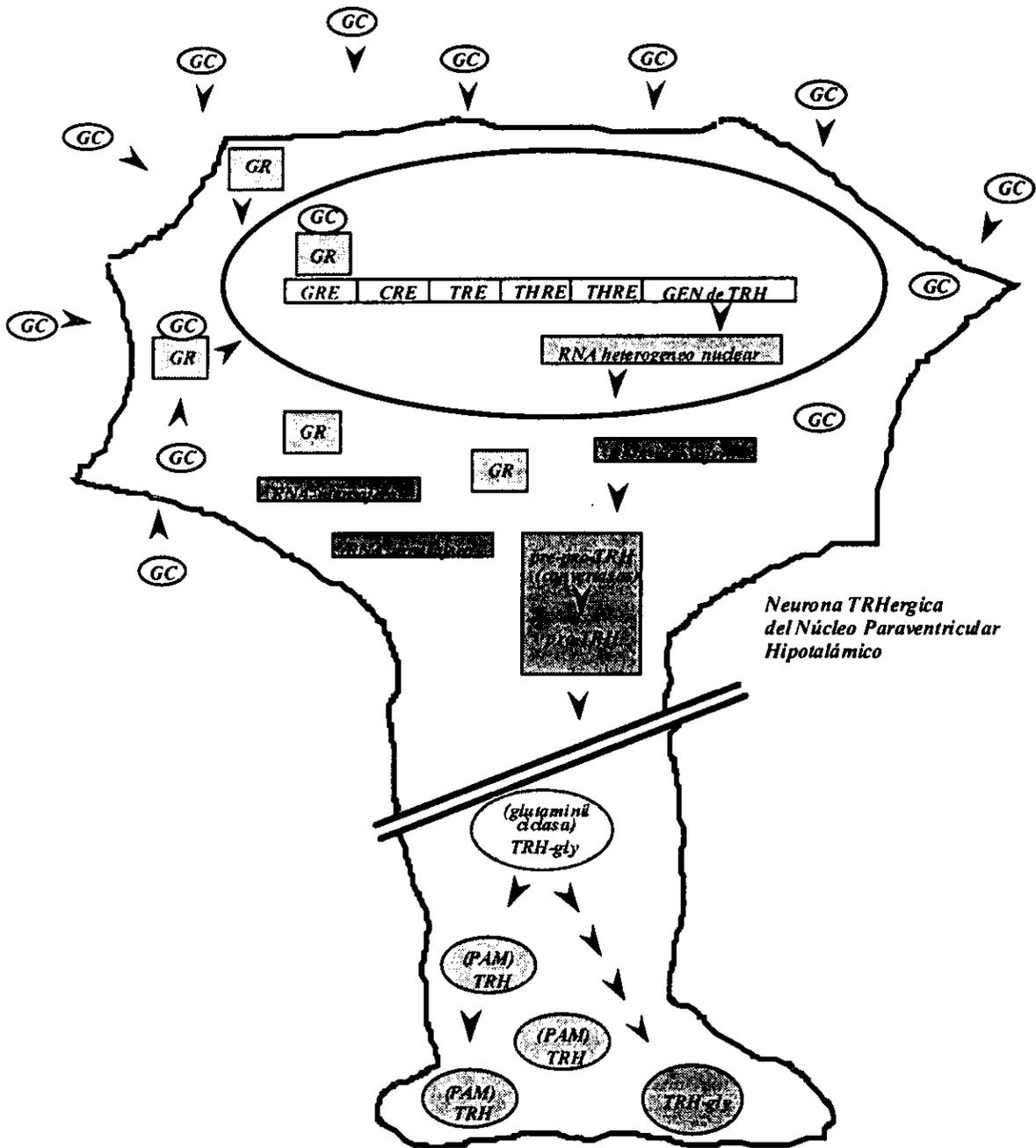


Fig. 15. Efecto propuesto de DEX sobre neuronas TRHérgicas. La DEX que ingresa a las células se une al receptor de glucocorticoides que se encuentra en el citosol produciendo la translocación de este al núcleo. El receptor se une en el promotor del gen de la TRH, al elemento de respuesta al receptor de glucocorticoides (GRE) activando la transcripción lo que se refleja en el incremento en los niveles de mRNA de TRH y del péptido intracelular. El incremento observado en los niveles de la TRH puede ser sin embargo solamente un reflejo de la traducción del mRNA de la TRH y a su vez de un incremento en la estabilidad de dicho mensajero. No hay evidencias en este caso de efectos sobre la liberación del péptido.

Ha sido reportado un incremento tanto en el mRNA de la TRH, como en el péptido maduro en cultivos primarios de neuronas diencefálicas de rata fetal mantenidos desde el inicio de cultivo en presencia de 8 Br-AMPC por cuatro días, más la adición al segundo día de DEX por un periodo de 7 días. Se sugiere que en este caso existe un aumento en la tasa de transcripción del gen de la pro-TRH, probablemente mediado por FOS y/o JUN por el incremento observado tanto en la concentración de mRNA de c-fos y c-jun, como en el número de células que muestran coexpresión con el mRNA de pro-TRH [81, 95, 128]. Los oligonucleótidos antisentido contra CREB anulan la respuesta de c-fos/c-jun (AP-1) al tratamiento por Dex, implicando la participación de CREB como mediador del estímulo glucocorticoide. Existen reportes de interferencia entre receptor de glucocorticoides y CREB por ejemplo en la inhibición de la transactivación de ciertos genes en células placentarias [97, 129]. No obstante por lo menos en los tiempos cortos ensayados en el presente trabajo, la supresión de la síntesis de proteínas producida con cicloheximida seguida por un tratamiento no mayor a 2 h con dexametasona, descartó esta posibilidad en nuestros tiempos y condiciones de cultivo.

La asociación de DEX y TPA muestra un efecto probablemente sinérgico a los 60 minutos en donde tal vez el mecanismo de acción de una y otra droga ocurra en diferentes niveles de la biosíntesis de la TRH pues las evidencias en este caso señalan que existe una represión mutua entre las actividades del receptor de glucocorticoides y AP-1 en el nivel transcripcional [130]. El incremento en la TRH total manifestado como aumento en el contenido celular, a los 120 minutos quizás refleje dicha interferencia pues el nivel del neuropéptido oscila entre lo que se midió bajo el efecto de cualquiera de las dos drogas por separado. Nuevamente a las 3 h se detectó un decremento significativo en la TRH liberada como en los tratamientos con TPA o DEX + 8Br-AMPC, atribuible a una degradación por PPII.

Hormonas tiroideas

Además de las funciones bien conocidas de las hormonas tiroideas como reguladoras de la expresión génica a las cuales se han estudiado en periodos de días, existen trabajos que muestran efectos rápidos de T_3 sobre la síntesis de mRNA que se reflejan en cambios en la concentración de proteínas, por ejemplo una supresión del mRNA de la globulina de unión a T_4 , en células HepG2, producida a la 8 h de la adición al medio de cultivo de 100 nmol/L de T_3 [85].

La presencia de T_3 por 24 hr inhibe la actividad del promotor del gen de la TRH cotransfectado con receptores de hormonas tiroideas en células de neuroblastoma humano HTB-11 [66]. En respuestas fisiológicas a eventos que pueden considerarse estresantes como el frío se han detectado incrementos de T_3 , 120 minutos después de aplicado el estímulo en ratas macho adultas [71].

El incremento observado en la expresión del mRNA de la TRH en los tiempos cortos estudiados es un efecto contrario al esperado y puede ser consecuencia de: 1) Un artefacto debido a un efecto de las hormonas tiroideas sobre la transcripción basal del control interno (G3PDH); 2) La resultante de todos los estímulos sobre el hipotálamo, puesto que en nuestras condiciones de cultivo no puede analizarse el comportamiento del NPV en particular; 3) la pérdida de sinapsis inhibitoras sobre las neuronas TRHérgicas, por ejemplo la pérdida de la vía monosináptica entre el núcleo arcuato (con una alta concentración de 5'-desiodasas tipo II) y las neuronas TRHérgicas [131]; 4) la acción sobre elementos de respuesta a hormona tiroidea diferentes a los descritos, o la acción sobre los elementos descritos pero en forma incompleta y/o la ausencia de corepresores como se ha observado en el gen de pro-TRH de ratón [132]; 5) que las neuronas habitualmente se cultivan en condiciones hipotiroideas y la adición de hormonas lo único que haga es llevar la expresión de la TRH a niveles cercanos a los fisiológicos.

Las dos fases de incremento son debidas tal vez a cambios en la concentración intracelular de T_3 y su transporte al núcleo por proteínas de unión con diferentes afinidades por la hormona de acuerdo a su concentración. Una proteína de unión a hormona tiroidea con una K_a en su sitio de alta afinidad de 1.2 a 3.7×10^{-9} M para T_3 y 3.7 a 5×10^{-8} para T_4 capturaría la mayor parte de hormona tiroidea en concentraciones mas altas. Por otra parte en una concentración de 300 nM se activaría la proteína citosólica de unión a T_3 que la translocaría al núcleo [133; 134].

Con relación al control interno, es necesario buscar alguno mas confiable dado que la G3PDH puede estar bajo el control de la T_3 como ocurre con otras enzimas metabólicas como la Glucosa 6 PDH y la enzima málica en el tejido adiposo pardo [135] (figura 16).

El estudio de la neuroendocrinología además de contribuir al conocimiento de la fisiología de un organismo, proporciona elementos de aplicación en la *medicina clínica*. Un ejemplo de ello son los desórdenes afectivos o del estado de ánimo como la *depresión mayor*, un padecimiento que se estima haberse presentado en algun momento de la vida adulta por lo menos en el 5 % de la población. Este síndrome se ha asociado a endocrinopatías como la *enfermedad de Cushing* o el *hiper- o hipotiroidismo*, así como a la administración crónica de glucocorticoides entre otros problemas. La relación en este caso

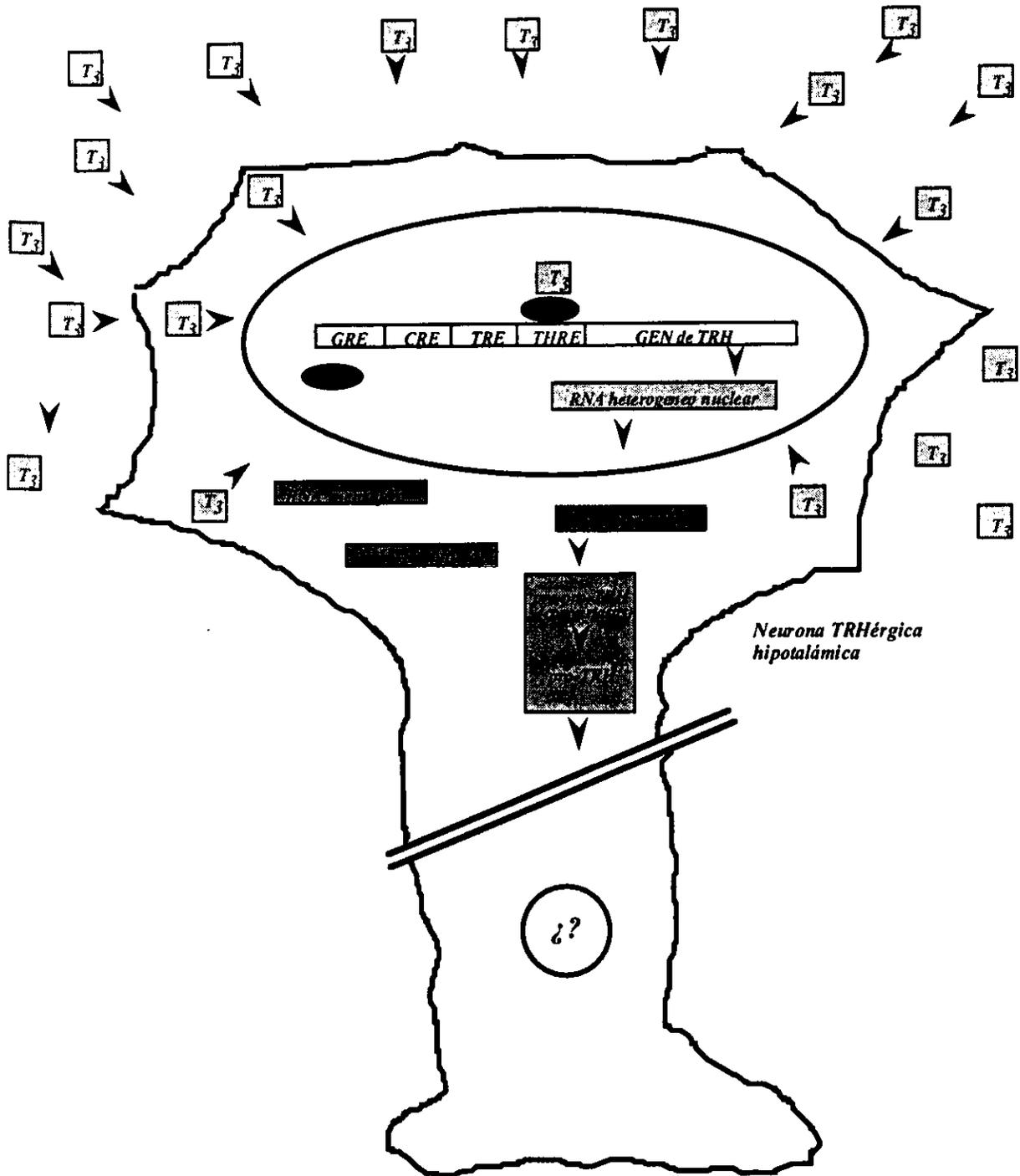


Fig 16. Efecto propuesto de hormonas tiroideas sobre neuronas TRHérgicas. El receptor de hormonas tiroideas (THR) aparentemente se encuentra unido en su forma no ligada al elemento de respuesta al receptor de hormonas tiroideas (THRE) en el promotor del gen de la TRH. La actividad sobre el subtipo de receptor y si el elemento de respuesta es positivo o negativo. La unión de la triiodotironina (T_3) al receptor en general produce un efecto sobre la actividad del gen opuesta a la que se observa cuando el receptor esta unido al DNA en su forma no ligada, y tal actividad se refleja en los niveles de mRNA de la TRH. En este trabajo se observó un incremento en la expresión del mRNA de la TRH dependiente de la dosis de T_3 y los mecanismos propuestos son un incremento en la transcripción o en la estabilidad del mensajero.

con la neuroendocrinología se debe a que presenta en algunos casos una respuesta deficiente de la ACTH a la CRH sugiriendo en este aspecto una anomalía de origen central. La prueba de supresión de cortisol con dexametasona (positiva en ausencia de supresión), aunque ha perdido fuerza como herramienta diagnóstica de *depresión mayor* sigue siendo útil para monitorizar la eficacia del tratamiento antidepresivo. El 25 a 30 % de los pacientes con *depresión mayor* además presentan respuestas deficientes de TSH a TRH. Esta deficiencia no es específica de episodios depresivos pero una respuesta exagerada de TSH a TRH sugiere un síndrome que podría confundir el diagnóstico de hipotiroidismo o depresión, y podría ser útil en identificar a los pacientes bipolares (maniaco-depresivos) tanto refractarios como a aquellos que evolucionan rápidamente, quienes se beneficiarían de suplementación tiroidea independientemente de la terapia clásicamente antidepresiva [136].

La interacción de medicamentos antidepresivos como los inhibidores de la recaptura de serotonina, ó como la dexametasona sobre la biosíntesis de la TRH son evidencias que apoyan, a nivel bioquímico, el papel del eje tiroideo en el desarrollo de trastornos afectivos, en este caso depresión [137].

El reto en el futuro en este campo será identificar:

1. La participación precisa de los ejes neuroendócrinos en estas patologías (etiología, cronicidad, complicaciones, etc) y sus interacciones.
2. Los fenómenos moleculares, bioquímicos, fisiológicos, farmacológicos, etc., que regulan el funcionamiento de dichos ejes a nivel central, específicamente la expresión de los genes que contienen la información para la síntesis de neurohormonas y,
3. La cronología de tales fenómenos (**figura 17**).

RECEPTORES PERIFERICOS (tacto, temperatura, presión, dolor, etc)

NUCLEOS CEREBRALES (del Rafé, arcuato, mesencefálicos, etc)

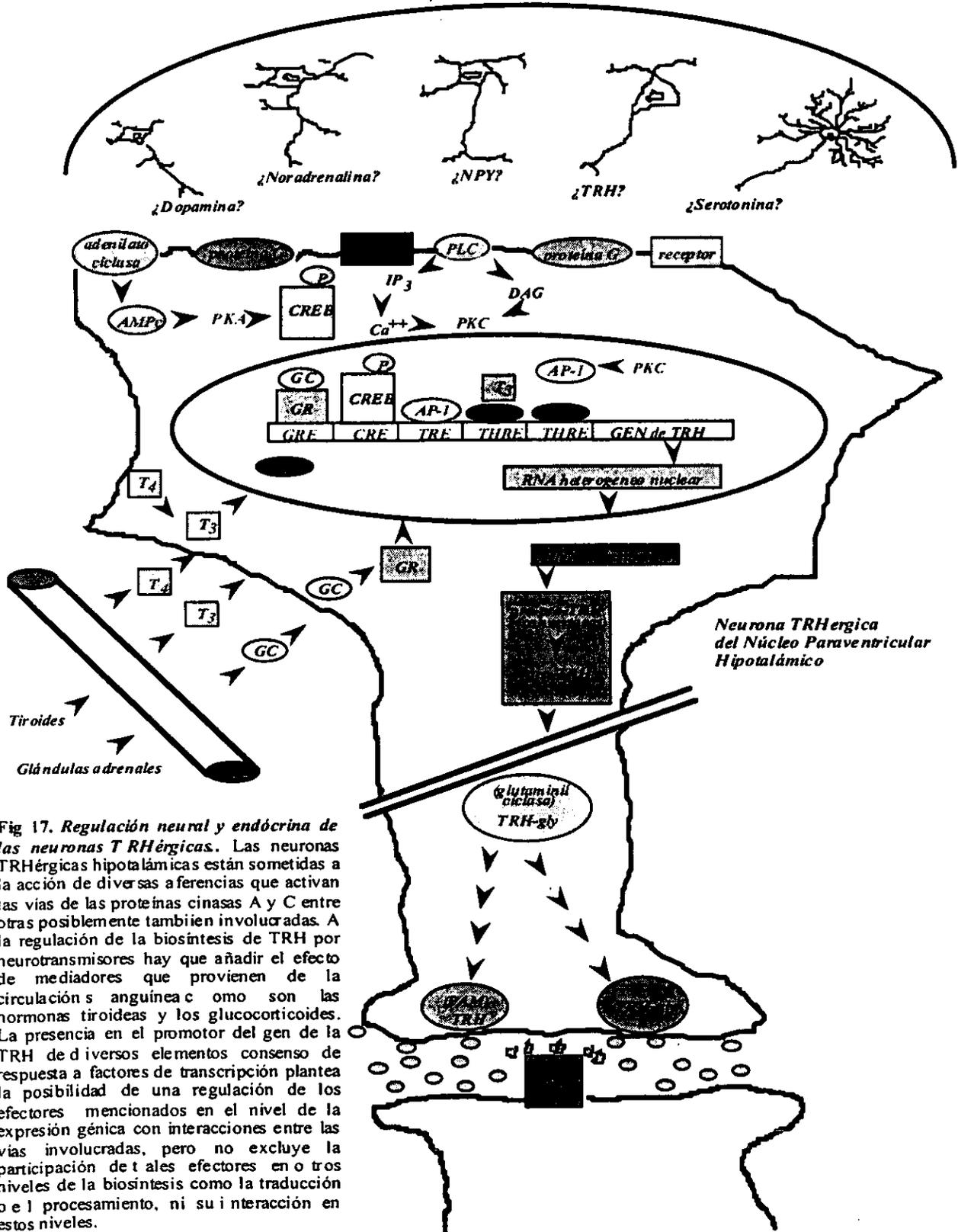


Fig 17. Regulación neural y endócrina de las neuronas TRHérgicas. Las neuronas TRHérgicas hipotálamicas están sometidas a la acción de diversas aferencias que activan las vías de las proteínas cinasas A y C entre otras posiblemente también involucradas. A la regulación de la biosíntesis de TRH por neurotransmisores hay que añadir el efecto de mediadores que provienen de la circulación sanguínea como son las hormonas tiroideas y los glucocorticoides. La presencia en el promotor del gen de la TRH de diversos elementos consenso de respuesta a factores de transcripción plantea la posibilidad de una regulación de los efectores mencionados en el nivel de la expresión génica con interacciones entre las vías involucradas, pero no excluye la participación de tales efectores en otros niveles de la biosíntesis como la traducción o el procesamiento, ni su interacción en estos niveles.

IX. CONCLUSIONES

A. Los activadores de las proteínas cinasas A (8Br-AMPC) y C (TPA) así como el glucocorticoide sintético DEX, tienen la capacidad de incrementar los niveles totales de TRH en células hipotálamicas fetales de rata, en cultivo en un período menor a 3 horas.

B. DEX produjo un incremento más rápido que los activadores de las proteínas cinasas A y C sobre los niveles de TRH en células hipotálamicas fetales de rata, en cultivo.

C. El 8Br-AMPC tiene efectos secretores sobre el TRH en un período menor a 3 h, inclusive cuando su acción se asocia a DEX.

D. Las hormonas tiroideas en dosis semejantes a las fisiológicas (T_3 1 nM), son capaces de incrementar el mRNA de la TRH en células hipotálamicas fetales de rata en cultivo, durante periodos de 24 h e inclusive de 3 h.

E. La presencia de hormonas tiroideas en dosis semejantes a las fisiológicas (T_3 1 nM) durante todo el período de cultivo, aparentemente no modifica los niveles de mRNA de TRH en comparación a sus controles.

X. PERSPECTIVAS

- A. Determinar si los efectos observados sobre el mRNA de TRH con los diferentes tratamientos estudiados hasta ahora, se deben a incrementos en la transcripción o en la estabilidad del mismo mensajero.**

- B. Determinar el nivel de las interacciones detectadas entre las vías de las proteínas cinasas A y C, los glucocorticoides y las hormonas tiroideas.**

- C. Analizar los efectos de las hormonas tiroideas sobre los niveles del péptido durante períodos breves.**

- D. Determinar cual es la concentración de hormonas tiroideas en que deben cultivarse las células hipotalámicas para considerar que sus condiciones de desarrollo son eutiroides.**

- E. Elegir un control interno para los niveles de RNAm de TRH mas confiable que el RNAm de G3PDH.**

- F. Perfeccionar la técnica de cultivo con el propósito de disecar una cantidad de tejido hipotalámico mas circunscrita en el area en donde se encuentra el NPV.**

XI. BIBLIOGRAFIA

1. Guyton, A.C.; 1986. Hormonas hipofisarias y su regulación por el hipotálamo; En: **Tratado de Fisiología Médica**. México, D.F., Nva Editorial Interamericana, S.A. de C.V., traductor: Dr. Santiago Sapiña Renard., p.876.
2. Green, J.D., & Harris, G.W.; 1947. The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis; **J.Endocrinol.** 5:136-146.
3. Guillemin, R., et al.; 1963. In vitro secretion of thyrotropin (TSH): stimulation by a hypothalamic peptide (TRF); **Endocrinology.** 73:564-572.
4. Schally, A.V., et al.; 1966. Purification of thyrotropin hormone-releasing factor from bovine hypothalamus; **Endocrinology.** 78:726-732.
5. Boler, J., et al.; 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline amide; **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 37:705-710.
6. Nair, R.M.G., et al. 1970. Structure of porcine thyrotropin releasing hormone; **Biochemistry.** 9:1103-1106.
7. Lechan, R.M., & Jackson, I.M.D.; 1982. Immunohistochemical localization of Thyrotropin releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary; **Endocrinology.** 111(1):55-65.
8. Grosvenor, C.E., & Mena, F.; 1980. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat; **Endocrinology.** 107(4): 863-8
9. Haisenleder, et al.; 1992. Differential actions of TRH pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro; **Endocrinology.** 130: 2915-2923.
10. Fleischer, N., et al.; 1972. Synthetic thyrotropin releasing factor as a test of pituitary thyrotropin reserve; **J. Clin. Endocrinol. Metabol.** 34:617-624.
11. Bowers, C.Y., et al.; 1971. Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolineamide; **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 45:1033-1041.
12. Blackwell, R.E., & Guillemin, R.; 1973. Hypothalamic control of adenohypophysial secretions; **Ann. Rev. Physiol.** 35:357-390.
13. Gallager, S.P., y O'Connor, B.; 1998. A study of a highly specific pyroglutamyl aminopeptidase type-II from the membrane fraction of bovine brain; **Biochemistry & Cell Biology.** 30: 115-133
14. Bowers, C.Y., et al.; 1967. Interactions of L-thyroxine or L-triiodothyronine and thyrotropin releasing factor on the release and synthesis of thyrotropin from the anterior pituitary gland of mice; **Endocrinology.** 81:741-747.
15. Fukuda, H., et al.; 1975. Acute effects of thyroxine, triiodothyronine, and iodine on thyrotropin secretion; **Endocrinology.** 97:924-931.
16. Brownstein, M.J., et al. 1974. Thyrotropin-releasing hormone in specific nucleic of rat brain; **Science.** 185:267-269.
17. Spindel, E., & Wurtman, R.J.; 1980. TRH immunoreactivity in the rat brain gerions, spinal cord and pancreas: validation by high -pressure liquid chromatography and thin layer chromatography; **Brain Research.** 201:279-288.
18. Brownstein, M.J., et al.; 1975. Effect of hypothalamic deafferentation on thyrotropin-releasing hormone levels in rat brain; **Proc. Natl. Acad. Sci.** 72: 4177-9.

19. Jackson, I.M.D.; 1983. Thyrotropin-releasing hormone (TRH): distribution in mammalian species and its functional significance; In: **Thyrotropin-Releasing Hormone**. Edit. Raven Press, New York, edited by E.C. Griffiths and G.W. Bennett., p. 3-17.
20. Stevenin, B., & Lee, S.L.; 1995. Hormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone (TRH) gene; **The Endocrinologist**. 5(4):286-296.
21. Covarrubias, L., et al.; 1998. Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels; **Biochem. Biophys. Res. Com.** 151(1): 615-622.
22. Uribe, R.M., et al.; 1991. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats; **Neuroendocrinology**. 54(5): 493-8.
23. Lee, S., et al.; 1988. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone; **J. Biol. Chem.** 263: 16604-16609.
24. Yamada, M., et al.; 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human pre-pro-thyrotropin-releasing hormone; **Mol. Endocrinol.** 4: 551-556.
25. Lee, et al.; 1993. A multifactorial site in the promoter of the rat thyrotropin releasing hormone (TRH) gene binds c-jun, CREB, and the thyroid hormone receptor; **The Endocrine Society. 75th Annual Meeting**, Las Vegas, NV, p.532.
26. Jackson, I.M.D., et al.; 1990. TRH prohormone: Biosynthesis, anatomic distribution, and processing. **Front. Neuroendocrinol**; 11:267-312.
27. Evans, R.M.; 1988. The steroid receptor and thyroid hormone receptor superfamily; **Science**. 240:889-895.
28. Balkan, W., et al.; 1998. Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1; **Endocrinology**. 139(1):252-259.
29. Lechan, et al.; 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain; **Science**. 231:159-161.
30. Bradbury, A.F., & Smyth, D.G.; 1991. Peptide amidation; **TIBS**. 16: 112-115.
31. O' Cuinn, Gerard. (ed); 1995. The production of biologically active peptides in brain tissues; En: **Metabolism of Brain Peptides**. Florida, U.S.A. CRC Press. p. 9.
32. Bell, J., et al.; 1997. Structural and functional investigations on the role of zinc in bifunctional rat peptidylglycine α -amidating enzyme; **Biochemistry**. 36: 16239-16246.
33. Bulant, et al.; 1990. Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biological active peptide, pre-pro-TRH (160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion; **Proc. Natl. Acad.Sci.** 87:4439-4443.
34. Ladram, et al.; 1994. Modulation of the biological activity of thyrotropin releasing hormone by alternate processing of pro-TRH; **Biochimie**. 76:320-328.
35. Arancibia, S., et al.; 1996. Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in Cold Environment; **Neuroendocrinology**. 64:257-267.
36. Shioda, S., et al.; 1986. Electron-microscopic cytometry of the catecholaminergic innervation of TRH neurons in the rat hypothalamus; **Cell. Tiss. Res.** 245:247-253.

37. Liposits, A.S., et al.; 1987. Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action; **Histochemistry**. 88:1-9.
38. Liao, N., et al.; 1991. Anatomical interactions of proopiomelanocortin (POMC)-related peptides, neuropeptide Y (NPY) and dopamine β -hydroxylase (DBH) fibers and thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus; **Neuropeptides**. 18:63-67.
39. Toni, R., et al.; 1990. Neuropeptide-Y-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus; **Endocrinology**. 26:2444-2453.
40. Dyess, E.M., et al.; 1988. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus; **Endocrinology**. 123(5):2291-2297.
41. Rettori, V., et al.; 1989. The somatostatinergic action of neuropeptide Y (NPY) on growth hormone (GH) secretion in the male rat; **71th Meeting of The Endocrine Society, Seattle WA**, p. 394 (abstract).
42. Toni, R., et al.; 1989. Somatostatinergic innervation of TRH neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus (PVN): evidence for unique specialization of contacts with a thyroid hormone-responsive cell; **71th Meeting of The Endocrine Society, Seattle WA, 1989**, p 338 (abstract).
43. Arancibia, S., et al.; 1989. Physiological evidence for α 1-adrenergic facilitatory control of the cold induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence; **Neurosci. Lett.** 100: 169-174.
44. Lamberton, P., & Jackson, I.M.D.; 1988. Neuroendocrine aspects of thyrotropin secretion; In: Collu, R., Brown, G.M. and Van Loon, G.R. (eds). **Clinical Neuroendocrinology**, Blackwell Scientific Publications, Boston, pp. 287-309.
45. Fuxe, K., et al.; 1989. Studies on the neurochemical mechanisms underlying the neuroendocrine actions of neuropeptide Y; Raven Press, New York, pp. 155-136.
46. Barofsky, A.L., et al.; 1983. Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release; **Endocrinology**; 113(5):1894-1903.
47. Habener J.F.; 1990. Cyclic AMP response element binding proteins: a cornucopia of transcription factors; **Molecular Endocrinology**. 4(8): 1087:1094.
48. Eckert, R., et al.; 1988. Mensajeros quimicos y reguladores; En: **Fisiología Animal. Mecanismos y Adaptaciones**. Madrid, España; Edit. McGraw-Hill-Interamericana; 3ª Edición; p. 301.
49. Greenspan, & Forsham; 1988. **Endocrinología básica y clínica**. Edit. Manual Moderno, S.A. de C.V., México, D.F., p.p.158-162.
50. Obregon, M.J., et al.; 1984. L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function; **Endocrinology**. 114(1):305-307.
51. Bernal, J., & Nunez, J.; 1995. Thyroid hormones and brain development; **European Journal of Endocrinology**. 133: 390-8.
52. Morreale de Escobar, G., et al.; 1990. Contribution of maternal thyroxine to fetal thyroxine pools in normal rats near term; **Endocrinology**. 126(5):2765-2767.
53. Walker, C.D., et al.; 1989. Modulation of the neonatal pituitary and adrenocortical responses to stress by thyroid hormones in the rat: effects of hypothyroidism and hyperthyroidism; **Neuroendocrinology**. 50:265-273.

54. Segerson, T.P., et al.; 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus; **Science**. 238:78-80.
55. Yamada, M., et al.; 1992. Influences of hypothyroidism on TRH concentrations and preproTRH mRNA levels in rat hypothalamus: a simple and reliable method to detect preproTRH mRNA level; **Neuroendocrinology**. 55:317-320.
56. Rondeel, J.M.M., et al.; 1988. Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood; **Endocrinology**. 123(1):523-527.
57. Koenig, R.J., et al.; 1989. Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing; **Nature**. 337(6208): 659-61.
58. Lazar, M.A., & Chin, W.W.; 1988. Regulation of two c-erbA messenger ribonucleic acids in rat GH3 cells by thyroid hormone; **Mol. Endocrinol.** 2(6): 479-84.
59. Katz, D., & Lazar, M.A.; 1993. Dominant negative activity of an endogenous thyroid hormone receptor variant (alpha 2) is due to competition for binding sites on target genes; **J. Biol. Chem.** 268(28): 20904-10.
60. Liu, R.T., et al.; 1995. The dominant negative effect of thyroid hormone receptor splicing variant alpha 2 does not require binding to a thyroid response element; **Mol. Endocrinol.** 9(1): 86-95.
61. Hodin, R.A., et al.; 1989. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific; **Science**. 244(4900): 76-9.
62. Li, M., & Boyages, C.; 1997. Expression of β_2 -thyroid hormone receptor in euthyroid and hypothyroid rat pituitary gland: an in situ hybridization and immunocytochemical study; **Brain Research**. 773:125-131.
63. Lechan, R.M., et al.; 1994. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus; **Endocrinology**. 135(1): 92-100.
64. Lechan, R.M., et al.; 1993. Immunocytochemical delineation of thyroid hormone receptor beta 2-like immunoreactivity in the rat central nervous system; **Endocrinology**. 132(6): 2461-9.
65. Schwartz, H.L., et al.; 1994. Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta 2 receptor (TR beta 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues; **J. Biol. Chem.** 269(40): 24777-82.
66. Feng, P., et al.; 1994. Ligand (T₃) dependent and independent effects of thyroid hormone receptors upon human TRH gene transcription in neuroblastoma cells ; **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 200(1):171-177.
67. Langlois MF, 1997. A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation; **J. Biol. Chem.** 272(40), 24927-24933.
68. Moisan, M.P., et al.; 1990. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase bioactivity and messenger RNA expression in rat forebrain: localization in hypothalamus, hippocampus, and cortex; **Endocrinology**. 127(3): 1450-1455.
69. Diaz, R., et al.; 1998. Distinct ontogeny of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor and 11-hydroxysteroid dehydrogenase types I and II mRNAs in the fetal rat brain suggest a complex control of glucocorticoid actions; **The Journal of Neuroscience**. 18(7): 2570-2580
70. Brown, M.R., & Hedge, G.A.; 1974. Effects of glucocorticoids on TRH and TSH secretion: dose and time considerations; **Am. J. Physiol.** 227(2): 289-94.

71. Van Haasteren, G., et al.; 1995. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotropin-releasing hormone (pro-TRH) mRNA and the hypothalamic release of pro-TRH-derived peptides: role of the adrenal gland; **Journal of Endocrinology**. 145:143-153.
72. Legradi, G., et al.; 1997. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamus paraventricular nucleus; **Endocrinology**. 138(6): 2569-2576
73. Kakucska, I., et al.; 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone; **Endocrinology**; 136(7):2795-2802.
74. Ceccatelli, S., et al.; 1989. Coexistence of glucocorticoid receptor-like immunoreactivity with neuropeptides in the hypothalamic paraventricular nucleus; **Exp Brain Res**. 78:33-42.
75. Sousa, R.J., et al.; 1989. In situ hybridization mapping of glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain; **Molecular Endocrinology**. 3(3):481-494.
76. Cintra, A., et al.; 1990. Evidence for thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in various preoptic and hypothalamic nuclei of the male rat; **Brain Research**. 506:139-144.
77. Tavianini, M.A., et al.; 1989. Dexametasone stimulates thyrotropin-releasing hormone production in a C cell line; **Mol Endocrinol**. 3(4): 605-610.
78. Bruhn, T.O, et al.; 1994. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. III. Stimulation by thyroid hormone: potentiation by glucocorticoids. **Endocrinology**. 134:826-830.
79. Bruhn, T.O., et al.; 1994. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. II. Stimulation by glucocorticoids. **Endocrinology**. 134:821-825.
80. Bruhn, T.O., et al.; 1996. Activation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured fetal diencephalic neurons by differentiating agents; **Endocrinology**. 137: 572-579.
81. Luo, L.G., et al.; 1995. Glucocorticoids stimulate thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured hypothalamic neurons. **Endocrinology**. 136(11):4945-4950.
82. Zoeller, R. T., et al.; 1990. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones; **Endocrinology**. 127(6): 2955-2962.
83. Uribe, R.M., et al.; 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus; **Neuroendocrinology**. 58:140-145.
84. Uribe, R.M., et al.; 1995. Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. **Neuroscience Letters**. 201:41-44.
85. Crowe, T.C., et al.; 1995. Down-regulation of thyroxine-binding globulin messenger ribonucleic acid by 3,5,3'-triiodothyronine in human hepatoblastoma cells; **J. Clin. Endocrinol. Metab**. 80(7): 2233-7.
86. Pérez Martínez, L., et al.; 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway; **Neuroendocrinology**. 68: 345-354.
87. Lowry, O.H., et al.; 1951. Protein measurement with the Pholin phenol reagent; **J. Biol. Chem**. 193: 265-275.
88. Chomczynski, P., & Sacchi, N.; 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; **Anal Biochem**. 162: 156-159.

89. Freshney, R.I.; 1983. The culture environment: II. Media and supplements: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Ed. Alan R. Liss, Inc., New York. p. 67-78.
90. Catalogo Sigma, 1999.
91. Charli, J.L., et al.; 1995. Homologous conditioned medium enhances expression of TRH in hypothalamic neurons in primary culture; **Developmental Brain Research**. 89: 155-160.
92. Joseph-Bravo, P., et al.; 1979. Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus; **Endocrinology**. 104: 801-806.
93. Grouselle, D., et al.; 1990. Evidence for high molecular weight immunoreactive thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor forms in the developing mouse hypothalamus. Simultaneous immunolocalization with TRH in cultured neurons; **Endocrinology**. 126: 2454-2464.
94. Glembotsky, C., et al.; 1986. Ascorbic acid increase the thyrotropin-releasing hormone content of hypothalamic cell cultures; **The Journal of Neuroscience**. 6(6): 1796-1802.
95. Pekary, A.E., et al.; 1991. Processing of TRH precursor peptides in rat brain and pituitary is zinc dependent; **Peptides**. 12(5): 1025-1032.
96. Luo, L.G., & Jackson, I.M.D.; 1998. Glucocorticoids stimulate TRH and c-fos/c-jun gene co-expression in cultured hypothalamic neurons; **Brain Research**. 791:56-62.
97. Luo, L-G., & Jackson, I.M.D.; Are multiple transcriptional factors involved in the glucocorticoid regulation of TRH gene expression in culture anterior pituitary cells; **P1-1050**.
98. Friedman, T.C., et al.; 1995. Processing of prothyrotropin-releasing hormone (pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes; **Endocrinology**. 136(10):4462-4472.
99. Kakucska, I., et al.; 1992. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus is dependent upon feedback regulation by both triiodothyronine and thyroxine; **Endocrinology**. 130(5): 2845-45.
100. Puymirat, J., et al.; 1983. Triiodothyronine enhances the morphological maturation of dopaminergic neurons from fetal mouse hypothalamus cultured in serum-free medium; **Neuroscience**. 10(3): 801-810.
101. Puymirat, J., et al.; 1985. Does triiodothyronine influence the morphogenesis of fetal mouse mesencephalic dopaminergic neurons cultured in chemically defined medium?; **Brain Res**. 355(2): 315-317.
102. Ruel, J., et al.; 1986. Regulation of protein phosphorylation by triiodothyronine (T₃) in neural cell cultures. Part II: Neurons; **Mol. Cell. Endocrinol**. 45(2-3): 233-240.
104. Vander, A.J., et al.; 1990. The sensory systems; **Human Physiology**. 5^a Ed., Edit. McGraw-Hill Publishing Company., U.S.A. p. 219-254
105. Kovacs, K. J., & Sawchenko, P. E.; 1996. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons; **The Journal of Neuroscience**. 16(1): 262-273.
106. Itoi, K., et al.; 1996. Major role of 3', 5'- cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase A pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo; **Endocrinology**. 137(6): 2389-2396.
107. Ohagi, S., et al.; 1992. Identification and analysis of the gene encoding human PC2, a prohormone convertase expressed in neuroendocrine tissues; **Biochemistry**. 89(June): 4977-4981.

108. Yaekura, K., & Yada, T.; 1998. [Ca²⁺]_i-reducing action of cAMP in rat pancreatic beta-cells: involvement of thapsigargin-sensitive stores; *Am. J. Physiol.* 274(2 pt 1): C513-21.
109. Lieste, J.R., et al.; 1996. Calcium oscillations in melanotrope cells of *Xenopus laevis* are differentially regulated by cAMP-dependent and cAMP-independent mechanisms; *Cell Calcium.* 20(4): 329-37.
110. Maggi, C.A., et al.; 1996. Protein kinase A inhibitors selectively inhibit the tonic contraction of the guinea pig ureter to high potassium; *Gen Pharmacol.* 27(2): 341-8.
111. Wong, A.O., et al.; 1994. Interactions of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, protein kinase-C, and calcium in dopamine- and gonadotropin-releasing hormone-stimulated growth hormone release in the goldfish; *Endocrinology.* 135(4): 1593-604.
112. Schafer, C., et al.; 1994. Effects of synthetic cyclic AMP analogs on amylase exocytosis from rat pancreatic acini; *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 72(10): 1138-47.
113. Fukayama, S., et al.; 1991. Protein kinase A-dependent inhibition of alkaline phosphatase release by SaOS-2 human osteoblastic cells: studies in new mutant cell lines that express a cyclic AMP-resistant phenotype; *Cell. Regul.* 2(11): 889-96.
114. Magni, P., et al.; 1992. Forskolin and phorbol ester stimulation of neuropeptide Y (NPY) production and secretion by aggregating fetal brain cells in culture: evidence for regulation of NPY biosynthesis at transcriptional and posttranscriptional levels; *Endocrinology.* 130: 976-984.
115. Cruz, C., et al.; 1991. Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase in primary cultures of fetal mouse brain; *Journal of Neurochemistry.* 56: 1594-1601.
116. Buchner, K., et al.; 1995. Protein kinase C in the transduction of signals toward and within the cell nucleus; *Eur. J. Biochem.* 228: 211-221.
117. Evans, R.M., & Arriza, J.L.; 1989. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system; *Neuron.* 2: 1105-1112.
118. Estupina, C., et al.; 1997. Rapid and opposite effects of dexamethasone on in vivo and in vitro hypothalamus somatostatin release; *Exp. Brain. Res.* 113(2): 337-342.
119. Harrison, R.W., et al.; 1979. Heterogeneity of AtT-20 cell glucocorticoid binding sites: evidence for a membrane receptor; *Adv. Exp. Med. Biol.* 117: 423-40.
120. Orchinik, M., et al.; 1991. A corticosteroid receptor in neuronal membranes; *Science.* 252(5014): 1848-51.
121. Orchinik, M., et al.; 1992. Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(9): 3830-4.
122. Moore, F.L., & Orchinik, M.; 1994. Membrane receptors for corticosterone: a mechanism for rapid behavioral responses in an amphibian; *Horm. Behav.* 28(4): 512-9.
123. Guo, Z., et al.; 1995. Binding characteristics of glucocorticoid receptor in synaptic plasma membrane from rat brain; *Funct. Neurol.* 10(4-5): 183-94.
124. Moore, F.L., et al.; 1995. Functional studies of corticosterone receptors in neuronal membranes; *Receptor.* 5(1): 21-8.
125. Orchinik, M., et al.; 1997. High-affinity binding of corticosterone to mammalian neuronal membranes: possible role of corticosteroid binding globulin; *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 60(3-4): 229-36.
126. Evans, S.J., et al.; 1998. Solubilization and pharmacological characterization of a glucocorticoid membrane receptor from an amphibian brain; *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 67(1): 1-8.

127. Mitsuma, T., et al.; 1993. Effects of dexamethasone on TRH, TRH-glycine and pre-pro-TRH (178-199) levels in various rat organs; **Endocr. Regul.** 27(2): 49-55.
128. Luo, L.G., y Jackson, I.M.D.; 1998. Glucocorticoids stimulate TRH and c-fos/c-jun gene co-expression in cultured hypothalamic neurons; **Brain Research.** 791:56-62.
129. Stauber, C., et al.; 1992. Mutual cross-interference between glucocorticoid receptor and CREB inhibits transactivation in placental cells; **New. Biol.** 4(5): 527-540.
130. Yang-Yen, H.F., et al.; 1990. Transcriptional interference between c-jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction; **Cell.** 62: 1205-1215.
131. Diano, S., et al.; 1998. Monosynaptic pathway between the arcuate nucleus expressing glial type II iodothyronine 5'-deiodinase mRNA and the median eminence-projective TRH cells of the rat paraventricular nucleus; **J. Neuroendocrinology.** 10(10): 731-42.
132. Satoh, T., et al.; 1996. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors; **J. Biol. Chem.** 271(44): 27919-26.
133. Lennon, A.M., et al.; 1983. A high affinity thyroid hormone binding protein in the cytosol of embryonic rat brain cells in primary cultures; **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 116(3): 901-8.
134. Nishii, Y., et al.; 1993. Induction of cytosolic triiodo-L-thyronine (T₃) binding protein (CTBP) by T₃ in primary cultured rat hepatocytes; **Endocr. J.** 40(4): 399-404.
135. Carvalho, S.D., et al.; 1993. Hormonal regulation of malic enzyme and glucose-6-phosphate dehydrogenase in brown adipose tissue; **Am. J. Physiol.** 264(6 Pt 1): E874-81.
136. Wilson, J.D., et al.; 1991. Psychiatry and Medicine; En: **Harrison's Principles of Internal Medicine.** U.S.A., Mc Graw Hill Inc. p. 2123.
137. Jackson, I.M.D., & Luo, L.G.; 1998. Antidepressants inhibit the glucocorticoid stimulation of thyrotropin releasing hormone expression in cultured hypothalamic neurons; **J. Investig. Med.** 46(9): 470-4.

XII. APENDICE

A. Cultivo primarios de células dispersas de hipotálamo fetal de rata:

1. Preparación de 1 L de hematoxilina:

- Poner a hervir 1 L de agua destilada, retirar del mechero y agregar 100 g de sulfato de aluminio y potasio. Poner a hervir por 5 min.
- Disolver la hematoxilina en un poco de alcohol o agua.
- Agregar la hematoxilina al agua hirviendo con sulfato de aluminio y potasio y hervir por 1 min.
- Retirar del fuego y añadir 2.5 de óxido rojo de mercurio. Hervir por otros dos minutos.
- Cuando se enfríe agregar 5 mL de ácido acético glacial en una campana de extracción.
- Observar cuando se forme una capa de aspecto metálico en la superficie del líquido y filtrar.

2. Preparación de 1 L de eosina:

- Preparar *solución 1* con 5 g de eosina yellow en 1L de agua destilada.
- Preparar *solución 2* con 8.2 g de acetato de sodio en 1 L de agua destilada.
- Mezclar 295 mL de *solución 1* con 705 mL de *solución 2*.
- Añadir 5 g de eosina y 2 cristales de tymol como conservador.
- Ajustar el pH a 4.98.

3. Solución Hank's (Para preparar 500 ml):

- | | |
|--|---------|
| a) Cloruro de Sodio (NaCl) | 4 g |
| b) Cloruro de Potasio (KCl) | 0.2 g |
| c) Fosfato de Potasio (KH ₂ PO ₄) | 0.030 g |
| d) Fosfato de Sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄) | 0.045 g |
| e) Glucosa | 0.50 g |

4. DMEM-S:

- 10 % de suero bovino fetal.
- 0.25 % glucosa (Sigma).
- 2mM glutamina (Sigma).
- antibiótico-antimicótico: 10,000 UI/mL de penicilina G sódica, 10,000 µg/mL de sulfato de estreptomycin, y 25 µg/mL de anfotericina B como fungizona (Gibco-BRL).

B. RIA

1. Curva de estándar interno:

- 10 microlitros (37.5 pg de TRH)
- 25 microlitros (93.75 pg de TRH)
- 50 microlitros (187.5 pg de TRH)
- 75 microlitros (281.5 pg de TRH)
- 100 microlitros (375.0 pg de TRH)

2. Buffer de fosfatos 50 mM:

- Preparar *solución A* disolviendo 27.6 g (0.2 moles) de fosfato sódico monobásico monohidratado en agua desionizada a un volumen total de 1 L.
- Preparar *solución B* disolviendo 28.4 g (0.2 moles) de fosfato sódico dibásico en agua desionizada a un volumen total de 1 L.
- Mezclar 16 ml de la *solución A* y 84 ml de la *solución B* y diluir a un volumen total de 400 ml.

3. Eter saturado: El eter saturado se prepara con 250 mL de eter + 250 mL de ácido acético al 20 %, mezclándolos aproximadamente 30 min., en campana dejando que se separen las fases y usando la superior.

C. Proteínas

1. Solución E:

- Mezclar 1 ml de tartrato de Na y K al 2%, con 1 ml de CuSO₄ al 1 %.
- Aforar la mezcla a 100 ml con Na₂CO₃ al 2 %.

D. Extracción de RNA

1. Solución D: Disolver en 65°C: 250 g de guanidinio tiocianato + 293 ml ddH₂O + 17.6 ml (0.75 M) de citrato de sodio, pH 7.0 + 26.4 ml (10%) de sarcosil.

E. Electroforesis

1. Buffer de carga:

- a) 0.25 % azul de bromofenol.
- b) 0.25 % xileno cianol FF.
- c) 30% glicerol en agua.