

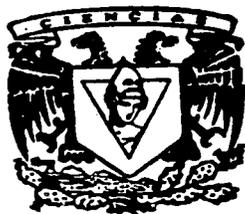


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DISEÑO DE OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO PARA  
REDUCIR LA TRANSMISION TRHERGICA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ARGEL AGUILAR VALLES



DIRECTOR DE TESIS:  
DR. GONZALO EMILIANO ARANDA ABREU

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2002



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunico a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Diseño de oligonucleótidos antisentido para reducir la transmisión TRHérgica".

realizado por Argel Aguilar Valles

con número de cuenta 9852718-6 , quién cubrió los créditos de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Gonzalo Emiliano Aranda Abreu

Propietario Dr. Enrique Merino Pérez

Propietario Dr. Federico Bermúdez Rattoni

Suplente Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Suplente Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo *P. de Gortari G.*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

DR. EBERTO NOVELO MALDONADO



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

*Dedicada a Francisco, Margarita y Malí.*

*A Manuel, Carlos, Luis, Julia, Felipe, Abraham, Sandra, Leti, Felipe Grande, Socorro y  
Martiniana.*

*A Jorge, Rocio, Arlene, Kasia, Eugenio, Vania, Elizabeth, Ilse, Karla y Waleeha.*

*A Dení, Juan, Sofía, Olachea y Paula.*

*A Patricia Joseph.*

Debo un profundo agradecimiento:

Al Dr. Gonzalo Aranda, director de esta tesis, por todo el esfuerzo y atención dedicados al proyecto.

A la Q.I. Fidelia Romero Arteaga, soporte fundamental en el aprendizaje y realización de la técnica de RT-PCR.

Al M. en C. Eugenio Bustos López, de la Unidad de Síntesis de Macromoléculas del IBT, por el suministro de oligonucleótidos.

Al Sr. Sergio Gonzalez Trujillo, de la Unidad de Bioterio por el cuidado de los animales empleados.

Al Sr. Manuel Villa Herrera y a la Sra. Cruz Elena Martell Lugo, constantes en el trabajo cotidiano de mantenimiento del laboratorio.

A los Dres. Rosa Maria Uribe y Jean Louis Charli, críticos del diseño de este proyecto.

A los revisores del trabajo escrito: Dres. Enrique Merino, Federico Bermúdez, Patricia Joseph y Patricia de Gortari, por sus acertadas y necesarias contribuciones.

A los compañeros de laboratorio: Ray, Lucia, Magda, Carlos, Miguel Cisneros, Miguel Vargas, Magali, Edith, Antonieta y Vicenta.

A mis compañeros del Taller.

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del IBT, UNAM, con el apoyo parcial de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN-216500) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 33351-N). Así mismo, durante la realización del proyecto se contó con las becas del Programa de Alta Exigencia Académica (PAEA) y del Programa de becas para la elaboración de tesis de licenciatura en proyectos de investigación (PROBETEL).

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
Biosíntesis y liberación de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH) .....	2
Degradación extracelular de la TRH .....	5
Los receptores de la TRH .....	7
Distribución del sistema de transmisión TRHérgico en al Sistema Nervioso Central ...	11
Efectos de la TRH extrahipotalámica .....	14
La estrategia de los oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido .....	18
JUSTIFICACIÓN .....	24
OBJETIVOS .....	25
MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
Diseño de los ODNs antisentido .....	26
Cultivo primario de células de pituitaria anterior .....	26
Transfecciones .....	28
Extracción de RNA total .....	28
Cuantificación del RNA .....	29
RT-PCR .....	29
Análisis estadístico .....	31
RESULTADOS .....	32
Diseño de los ODNs antisentido .....	32
Ensayo con los ODNs del TRH R1 .....	35
DISCUSIÓN .....	53
PERSPECTIVAS .....	59
BIBLIOGRAFÍA .....	60
ANEXO 1: BLAST de la secuencia sentido de los ODNs antisentido .....	73
ANEXO 2: Resultados de Oligo v.4.0 para los ODNs antisentido .....	83
ANEXO 3: Blast y resultados de Oligo v.4.0 para RDMR1-1 y RDMR1-4 .....	86

## INTRODUCCIÓN

Ernst y Berta Scharer formularon el concepto de neurosecreción basándose en estudios anatómicos que sugerían la existencia de células nerviosas especializadas capaces de sintetizar y secretar, al flujo sanguíneo, verdaderas hormonas con sitios de acción en puntos distantes al de su secreción (Scharer y Scharer, 1945).

No fue sino hasta los años 50 cuando el campo de la neuroendocrinología fue establecido firmemente gracias a las aportaciones de Vincent Du Vigneaud y colaboradores, quienes aislaron la oxitocina y la vasopresina, elucidaron su estructura química, y las identificaron como nonapéptidos, convirtiéndose en las primeras sustancias reconocidas como hormonas neuropeptídicas (Bauer, *et al*, 1999).

Por otro lado, existían datos que sugerían que la pituitaria anterior estaba bajo la regulación del hipotálamo, aunque con detalladas descripciones anatómicas y estudios embriológicos se había establecido con claridad que la adenohipófisis no estaba innervada por neuronas. Fueron otros estudios anatómicos los que proveyeron una explicación posible para las observaciones fisiológicas, demostrando la existencia de vasos capilares fenestrados que iban desde la eminencia media hasta la pituitaria anterior, permitiendo la conexión entre el hipotálamo y la adenohipófisis.

Finalmente fue G.W. Harris quien propuso, basado en datos fisiológicos, el concepto de sistema de quimiotransmisión hipotálamo-hipofisiario de sangre portal. Esta hipótesis fue recibida con escepticismo hasta el descubrimiento de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH por sus siglas en inglés) en 1969, lo que validó el concepto de control hipotalámico de la secreción hormonal de la pituitaria anterior (Guillemin, 1978). La TRH (piroGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) resultó ser la primer hormona hipotalámica hipofisiotrópica en ser aislada y caracterizada estructuralmente, lo que implicó el inicio de la neuroendocrinología moderna.

Así pues, la TRH fue nombrada en base a la capacidad de estimular la secreción de tirotrópina (TSH) de la pituitaria anterior (Schally, *et al*, 1969), después de haber sido transportada a través de los axones hacia las terminales nerviosas de las neuronas parvocelulares del núcleo paraventricular hipotalámico, y de ser liberada al sistema de sangre portal (Bauer, *et al*, 1999).

Estudios subsecuentes en células tumorales, confirmados *in vivo* en humanos, mostraron que la TRH posee otras funciones neuroendócrinas en la adenohipófisis ya que es un potente estimulador de la secreción de prolactina y, bajo ciertas condiciones fisiológicas (algunas de ellas patológicas como en

pacientes acromegálicos o con funciones metabólicas perturbadas), estimula la liberación de la hormona de crecimiento (Morley, 1981).

En la rata, el hipotálamo contiene cerca del 30% de la TRH total del sistema nervioso central, el resto se ha identificado en: el sistema olfatorio, el núcleo reticular talámico, el complejo amigdalario, la pituitaria posterior, la retina (donde el contenido de TRH varía con la iluminación, siendo bajo por la noche y alto en el día), la glándula pineal, la espina dorsal, las células  $\beta$  pancreáticas neonatales (donde se piensa que modula la secreción de la insulina) (Yamada, 2000), el tracto intestinal, el corazón (participando en la contracción muscular) y las células de Leydig de los testículos (Bauer, *et al*, 1999; Heuer, *et al* 2000).

Específicamente, la pituitaria posterior contiene la más alta concentración de TRH después del hipotálamo, encontrándose almacenada en las terminales nerviosas de las neuronas magnocelulares, junto con la vasopresina y/o la oxitocina (Jackson y Reichlin, 1974).

La distribución descrita de la TRH (Lechan, *et al*, 1986b), así como de sus receptores (Cálza, *et al*, 1992; Cao, *et al*, 1998; Itadani, *et al*, 1998), y el hecho de que su administración en el sistema nervioso central (SNC) estimule una serie de cambios conductuales y electrofisiológicos, sugieren que actúa como neuromodulador o neurotransmisor, amplificando o amortiguando la actividad de otros sistemas de neurotransmisión (Horita, 1998; Bauer, *et al*, 1999). Estos aspectos serán tratados con detalle más adelante.

## BIOSÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)

Inicialmente, y considerando el pequeño tamaño de la molécula, se propuso que la TRH debía sintetizarse por un mecanismo enzimático no ribosomal, semejante al del glutatión, la carnosina y algunos péptidos antibióticos (Reichlin, 1989). Sin embargo, los experimentos de Rupnow en 1979, proveyeron evidencia que favorecía la hipótesis de la síntesis de la TRH a partir del procesamiento postraduccional de un precursor proteico de alto peso molecular (Rupnow, *et al*, 1979; Lee, *et al*, 1988).

En 1984, basándose en el descubrimiento de que la TRH es muy abundante en la piel de *Xenopus*, Richter clonó parcialmente un DNA complementario (DNAc) que codificaba para la región amino terminal de la preproTRH y contenía tres copias de la secuencia Lis - Arg - Gln - His - Pro - Gli - Lis/Arg - Arg (Richter, *et al*, 1984).

A partir de esta estrategia se clonó el DNAc completo de la preproTRH de *Xenopus*, sin embargo, el enfoque no funcionó en la clonación de este DNAc en mamíferos (Bauer, *et al*, 1999). Fue

solo después de que se generó un antisuero que reconocía la parte central de una supuesta secuencia de la preprohormona, que se identificó al precursor de la TRH, se dedujo la secuencia del DN<sup>A</sup>c y se buscó en una biblioteca de expresión de hipotálamo de rata en el bacteriófago  $\lambda$ gt 11 (Lechan, *et al*, 1986). La secuencia de nucleótidos de la clona más grande contenía un marco abierto de lectura de 765 nucleótidos, flanqueado por otros 102 que correspondían a la región 5' no traducida y 450 en la región 3'. El RNA mensajero (RNAm) codifica para una proteína de 255 aminoácidos, que contiene 5 secuencias progenitoras de la TRH (Gln – His – Pro – Gli) flanqueadas por pares de aminoácidos básicos y unidas por péptidos conectores (Lechan, *et al*, 1986; Valentijn, *et al*, 1998).

En 1988 Lee, *et al* elucidaron la estructura del gen de la preproTRH de la rata, el cual comprende 2.6 kb y está formado de 3 exones y de 2 intrones. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida del RNAm, el exón 2 contiene la secuencia del péptido señal y la de una porción del segmento amino terminal de la proteína, mientras que en el exón 3 se encuentran las 5 copias del progenitor de la TRH y la región 3' no traducida (Lee, *et al*, 1988). La misma arquitectura de intrones y exones fue descrita para el gen del precursor de la TRH humana, aunque éste tiene un tamaño mayor, 3.3 kb. y codifica para una proteína de 242 aminoácidos, con seis copias de la secuencia progenitora de la TRH (Bauer, *et al*, 1999).

Algunos elementos característicos de los promotores están presentes en el gen de la preproTRH, incluyendo una caja TATA a 28 pares de bases (pb) del sitio de inicio de la transcripción; una región rica en GC a 113 pb del mismo punto, en la cual se identificó al hexanucleótido característico de las regiones de unión de SP1 (que conforma el elemento de respuesta al factor de crecimiento epidérmico); tiene además una secuencia idéntica a la consenso de unión para el receptor de glucocorticoides (GRE), dos elementos imperfectos de respuesta a AMP cíclico (CRE) y otro para el receptor de hormonas tiroideas (TRE) (Lee, *et al*, 1988).

La TRH se forma a partir del precursor proteico por la acción sucesiva de convertasas de la prehormona (que lo rompen en los residuos de aminoácidos dibásicos), de las carboxipeptidasas E y D, de la monooxigenasa  $\alpha$  – amidante de la peptidilglicina (PAM) y de la glutamil ciclase (Bauer, *et al*, 1999).

Después del procesamiento de los precursores de la TRH de la rata y del humano se producen seis y siete péptidos conectores respectivamente, y se ha sugerido que éstos pueden tener alguna relevancia fisiológica (Bauer, *et al*, 1999). De hecho, el péptido preproTRH 160 – 169 (Ps4) de la rata es liberado de las neuronas por agentes despolarizantes y, a través de inmunohistoquímica, se observó

una densa acumulación de Ps4 en las terminales nerviosas de la zona externa de la eminencia media (Valentijn, *et al* 1998). Ps4 incrementa, *in vitro*, la secreción de TSH dependiente de la TRH (Valentijn, *et al*, 1998) y eleva, *in vitro* e *in vivo*, el nivel de los RNA mensajeros de TSH $\beta$  y de la prolactina (Carr, *et al*, 1992). Incluso se ha demostrado la existencia de sitios específicos de unión para Ps4 en la pituitaria anterior (sobre células del tipo folículo esteladas), en el cerebro y en varios órganos periféricos (Valentijn, *et al*, 1998). Otro péptido críptico, Ps5 (preproTRH 178 – 199), ha sido considerado como un potente inhibidor de la liberación de corticotropina y de la hormona de crecimiento (Valentijn, *et al*, 1998), aunque sus efectos no han sido reproducibles (Bauer, *et al*, 1999).

El proceso de liberación de la TRH ocurre por exocitosis regulada en respuesta a un estímulo. Los sistemas endócrino, nervioso e inmune regulan la biosíntesis en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y la liberación de la TRH de la eminencia media (Lechan y Toni, 1992; Joseph-Bravo, *et al*, 1998). Se ha demostrado que en el NPV la regulación de la TRH es rápida y transitoria, en respuesta a estímulos como la exposición al frío o, en la madre lactante, la succión por las crías (Uribe, *et al*, 1993). Dicha regulación puede ser debida a estimulación neuronal, ya que la incubación de células hipotalámicas con drogas que alteran la actividad de las vías de transducción de señales de la PKC o de la PKA causan un aumento en los niveles de RNAm de la TRH (Uribe, *et al*, 1995).

En los paradigmas *in vivo* mencionados hay un incremento en los niveles séricos de corticosterona, por lo cual Pérez-Martínez y colaboradores (1998) indagaron el efecto de esta hormona en la biosíntesis de la TRH *in vitro* encontrando un incremento en los niveles de RNAm de la preproTRH a una hora de incubación. Sí bien, tanto el 8BrAMPc (un activador de la vía de la PKA) como la dexametasona (un análogo de la corticosterona) provocaron la estimulación descrita, combinados causan un fuerte decremento del RNAm (Pérez Martínez, *et al*, 1998); ésto podría explicar la transitoriedad del incremento del RNAm observada *in vivo*.

Además de los aspectos de regulación ya mencionados, se comienzan a identificar otros; por ejemplo, en la respuesta al ayuno en animales adultos se observa hipotiroidismo y un decremento importante en los niveles de RNAm de la preproTRH, mientras que la liberación de corticosterona se encuentra incrementada. Se ha postulado que en este paradigma las neuronas del núcleo arcuato controlan a las células TRHérgicas del NPV, mediante la liberación del neuropéptido Y y del agouti, ambos sujetos a su vez de regulación por la leptina (hormona liberada de tejido graso que interviene en la regulación de la ingesta y se inhibe en respuesta al ayuno) (Legradi y Lechan, 1998). En el mismo paradigma las ratas recién destetadas muestran una liberación aún mayor de corticosterona, pero no

presentan el efecto del ayuno en los niveles de la TRH en contraste a los observado en ratas adultas (De Gortari, *et al*, 2000a).

De los mecanismos regulatorios mejor caracterizados en la síntesis de la TRH es el de las hormonas tiroideas ( $T_3$ ), productos finales del eje hipotálamo – hipófisis – tiroides. En principio se identificó que los niveles de la preproTRH y de su RNAm se incrementan en las neuronas parvocelulares del NPV de ratas hipotiroideas y disminuyen en ratas hipertiroideas (Segerson, *et al*, 1987). El efecto es directo y específico a la zona, pues el implante de cristales de  $T_3$  en el NPV de ratas hipotiroideas produce un decremento del RNAm y de la prohormona en el dominio parvocelular, pero no en otras regiones del hipotálamo (Dyess, *et al*, 1988).

La localización por inmunocitoquímica de los subtipos funcionales de los TR ( $TR\alpha_1$  y  $TR\beta_2$ ) en la mayoría de las neuronas parvocelulares TRHérgicas del NPV (Lechan, *et al*, 1994) y la presencia en la región 5' del gen de la TRH de dos TRE (Stevenin y Lee, 1995), apoyan la hipótesis de la acción directa de las hormonas tiroideas en la regulación de la síntesis de TRH en la zona hipofisiotrópica del NPV.

#### DEGRADACIÓN EXTRACELULAR DE LA TRH

El mecanismo principal de inactivación de la TRH es, como para la mayoría de los péptidos, la acción de una peptidasa (Charli, *et al*, 1998). Las peptidasas pueden estar solubles en el medio extracelular o embebidas en la membrana plasmática, pero con su sitio activo dirigido hacia la región extracelular (ectoenzimas). Charli, Joseph-Bravo y colaboradores identificaron una aminopeptidasa de alta especificidad para la TRH que parece ser la encargada de inactivar al péptido en el medio extracelular (Garat, *et al*, 1985; Torres, *et al*, 1986). Esta ectoenzima, la piroglutamil aminopeptidasa II (PP II; EC 3.4.19.6) hidroliza el enlace pGlu-His para producir pGlu e His-ProNH<sub>2</sub>, dos productos que no tienen afinidad por el receptor de la TRII, inactivando así al péptido (Charli, *et al*, 1998).

La PPII sólo reconoce substratos peptídicos cuya estructura sea pGlu-His-X donde X = Pro, Trp, Ala, Pro-Gly, ProNH<sub>2</sub> (TRH) ó pro-NA (pro- $\beta$ naftilamida). La Km para la TRH es de 40  $\mu$ moles por litro y su actividad es máxima en el intervalo de pH neutro (Charli, *et al*, 1998). La purificación de la enzima permitió determinar la secuencia del DNAC, además se identificó una sola copia del gen en la rata y al menos 3 especies diferentes de RNAm (Charli, *et al*, 1998).

La PPII es una glicoproteína integral de membrana de tipo II, probablemente formada por un homodímero unido no covalentemente (cada monómero es de 1025 aa; el peso de cada uno es de 115

kDa aproximadamente). Cada monómero tiene un solo fragmento transmembranal, una pequeña parte intracelular y un dominio extracelular muy grande que contiene la secuencia consenso de las metalopeptidasas, His-Glu-X-X-His, con un residuo adicional de Glu apartado 18 aminoácidos del consenso y sitios potenciales de glicosilación y sulfatación (Schauder, *et al*, 1994). En la región intracelular existe un sitio potencial de fosforilación que pudiera participar en la regulación de la enzima (Bauer, 1994).

La actividad de la PPII está presente en varios órganos incluyendo el cerebro y la adenohipófisis (O'Connor y O'Cuinn, 1984; Friedman y Wilk, 1986; Charli, *et al*, 1988; Bauer, 1988; Bauer, *et al*, 1990). En el cerebro su distribución es heterogénea (Vargas, *et al*, 1992), con los niveles más altos de actividad en la corteza cerebral, el bulbo olfatorio, el hipocampo y el cerebelo (Charli, *et al*, 1998). La actividad de la enzima se detecta en neuronas (Bauer, *et al*, 1990; Cruz, *et al*, 1991) a nivel sináptico (O'Connor y O'Cuinn, 1984), probablemente en la membrana postsináptica (Joseph-Bravo, *et al*, 1994). La PPII localizada en la adenohipófisis se encuentra preferencialmente en la superficie de los lactótrofos (Bauer, *et al*, 1990). Niveles bajos de actividad de la enzima se han detectado en varios tejidos periféricos, como el pulmón y el bazo (Vargas, *et al*, 1992).

Una forma soluble, la tiro liberinasa, con propiedades muy similares a la ectoenzima se encontró en el suero (Bauer y Novak, 1979); se propone que proviene del mismo gen (Schmitmeier, *et al*, 2002).

La mayoría de los datos mencionados indican que la PPII tiene un papel substancial en la inactivación extracelular de la TRH. Los experimentos con inhibidores sintéticos específicos confirmaron que la enzima es la encargada de inactivar a la TRH liberada en el espacio sináptico en rebanadas de cerebro (Charli, *et al*, 1989).

En la adenohipófisis, la actividad de la PPII está siendo regulada por hormonas periféricas, en particular hormonas tiroideas y estrógenos, que la activan e inhiben respectivamente (Bauer, 1988). Además, su expresión varía durante el ciclo estral, pero estas fluctuaciones no están en fase con los niveles circulantes de estrógenos, probablemente reflejando respuestas a otros factores, posiblemente de origen hipotalámico. Uno de estos factores es la TRH, ya que las fluctuaciones de la PPII en la adenohipófisis son opuestas a lo observado en los niveles del RNAm de la preprohormona (un indicador de la tasa de secreción del péptido) en el NPV (Uribe, *et al*, 1991).

Varias neurohormonas que regulan la síntesis y la secreción de prolactina también regulan la actividad de la enzima en cultivos primarios de células adenohipofisarias. Así, la TRH inhibe la actividad de la PPII, mientras que la somatostatina y la dopamina (a través de su receptor D2) la

inducen y antagonizan el efecto de la TRH. (Vargas, *et al*, 1994; 1998; Bourdais, *et al*, 2000). La alteración de varias vías de segundos mensajeros en los cultivos primarios de la pituitaria anterior, ha permitido identificar los mecanismos por los cuales la actividad de la PPII está siendo regulada (Charli, *et al*, 1998), de tal forma que la inhibición a largo plazo de su actividad es inducida por la activación de la PKC, la PKA, el incremento de los niveles intracelulares de calcio, o la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> tipo L (Vargas, *et al*, 2002).

Se ha postulado que la PPII también pudiera estar regulada en el SNC cuando se activan las neuronas TRHérgicas. Varios estudios *in vivo* confirmaron que la PPII, en contraste con lo observado en la hipófisis, no está regulada en el cerebro por cambios en el estado tiroideo (Charli, *et al*, 1998). Sin embargo, sí se puede regular en dos modelos en los cuales se piensa que ocurre la activación de neuronas TRHérgicas: la estimulación eléctrica subumbral (kindling) (de Gortari, *et al*, 1995; 2002, sometido), y la inyección aguda de etanol (de Gortari, *et al*, 2000b).

## LOS RECEPTORES DE LA TRH

La TRH actúa a través de dos tipos de receptores diferentes: el TRH R1 y el TRH R2.

El TRH R1 es el receptor que media los efectos hipofisiotrópicos de la TRH en la pituitaria anterior (en la que está localizado en la superficie de somatotropos, mamótropos y tirótropos) (Konaka, *et al*, 1997). Su DNAC fue aislado de células de la pituitaria de ratón empleando una estrategia de clonación – expresión (Gershengorn y Osman, 1996; Cao, *et al*, 1998). A partir de este DNAC se predijo una proteína transmembranal de 393 amino ácidos, con un peso molecular calculado de 44.5 kDa que pertenecía a la super familia de la bacteriorodopsina (Bauer, *et al*, 1999).

El DNAC del TRH R1 se clonó a partir de distintas especies (humano, rata, ratón, pollo y bovino), mostrando un alto grado de similitud en la secuencia de amino ácidos, siendo el extremo C terminal la zona de mayor variación (Zhao, *et al*, 1992; Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999; Iwasaki, *et al*, 1996).

El gen del TRH R1 del humano comprende más de 30 kb y contiene tres exones: el 1 corresponde a la región 5' no traducida del RNAm, el intrón 1 es de 541 nucleótidos de longitud y termina 88 bases antes del sitio de inicio de traducción (Iwasaki, *et al*, 1996). Los exones 2 y 3 están separados por un segundo intrón que se extiende por más de 25 kb y separa a las regiones que codifican para los dominios transmembranales 5 y 6 (Iwasaki, *et al*, 1996, Bauer, *et al*, 1999).

Se ha descrito el procesamiento alternativo de un intrón en los transcritos del TRH R1 de la pituitaria de la rata y del ratón, todos estos DNAc codifican para receptores funcionales con respuestas electrofisiológicas indistinguibles (Gershengorn y Osman, 1996; Cao, *et al*, 1998).

El TRH R1 posee tres sitios potenciales de N – glicosilación en la región amino-terminal y en el segundo lazo extracelular, estando al menos uno glicosilado *in vivo* pues el receptor se une a las columnas de afinidad de lectina (Gershengorn y Osman, 1996); dos cisteínas (cada una en un lazo extracelular diferente) pudiesen estar implicadas en la formación de un enlace disulfuro (Gershengorn, 1993) y tiene sitios probables de fosforilación en uno de los lazos intracelulares y en el extremo carboxilo terminal (Gershengorn y Osman, 1996).

El TRH R2 se aisló más recientemente de dos bibliotecas de DNA complementario, una de tallo cerebral y espina dorsal, y otra del cerebro total de la rata. La identidad general que guarda con el TRH R1 es de 50.6%, y presenta un extremo C terminal más corto que cualquiera de las formas alternativas del TRH R1 (Heucr, *et al* 2000; O'Dowd, *et al* 2000; Cao, *et al* 1998). El análisis de su DNAc reveló que la proteína está compuesta de 352 aminoácidos (O'Dowd, *et al*, 2000), tiene un sitio potencial de N – glicosilación en el extremo N terminal y varias serinas y treoninas en el carboxilo terminal y el tercer lazo intracelular, que son sitios probables de fosforilación y regulación (Cao, *et al*, 1998).

Al igual que todas las isoformas del tipo 1 de receptores de la TRH, el TRH R2 es una proteína integral de membrana, con siete dominios transmembranales, que pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (Cao, *et al*, 1998). El TRH R1 está acoplado a las  $G_q$  y  $G_{11}$ , ambas insensibles a la toxina pertúsica; se ha sugerido que también puede unirse a  $G_{i-2}$ ,  $G_{i-3}$  y una proteína semejante a las  $G_s$ , en condiciones y tipos celulares particulares (Gershengorn y Osman, 1996).

Las regiones de TRH R1 involucradas en el acoplamiento a las proteínas G parecen reducirse a la zona yuxtamembranal del lazo intracelular 3, aunque se requieren estudios más profundos sobre la interacción entre el receptor 1 y las proteínas G (Gershengorn y Osman, 1996).

Los dos receptores presentan activación basal ligando independiente, la cual es mayor en el TRH R2 que en el TRH R1 (Wang y Gershengorn, 1999). Esta actividad basal, cuyo papel fisiológico se desconoce, así como la inducida por la TRH, están mediadas por la activación de la vía de la fosfolipasa C fosfoinosítido específica (mejor caracterizada en las células de la adenohipófisis) (Gershengorn y Osman, 1996). La fosfolipasa C hidroliza al fosfatidil inositol 4,5 – bifosfato, para generar 2 segundos mensajeros, el inositol 1,4,5 – trifosfato y el 1,2 – diacilglicerol (Gershengorn y Osman, 1996). Uno de

los efectos finales de estas vías de segundos mensajeros, mediado en parte por el factor de transcripción AP1, consiste en la inducción de la expresión génica.

El 1,2 – diacilglicerol activa a la PKC y el inositol 1,4,5 – trifosfato estimula la liberación de calcio intracelular que activa a la proteína cinasa dependiente del complejo calcio/calmodulina (Wang y Maurer, 1999), la cual regula la transcripción por medio de CREB – P. El TRH R1 también activa la vía de señalización de la proteína cinasa mitógeno activada (MAPK) (Wang y Gershengorn, 1999), lo que podría estar jugando un papel importante en la regulación de la transcripción del gen de la prolactina (Wang y Maurer, 1999). La activación de esta vía está mediada por al menos dos de los mecanismos de señalización primarios que el TRH activa al unirse al receptor 1, el de la PKC y el incremento de los niveles intracelulares de calcio (Wang y Maurer, 1999).

Un análisis de unión de la TRH al TRH R1 en distintos valores de pH, y la mutación de residuos de aminoácidos cargados negativamente en el receptor, permitieron concluir que la TRH se une a su receptor como una especie no protonada, y que no establece ninguna interacción iónica, siendo los puentes de hidrógeno los enlaces de más alta energía entre las dos moléculas (Gershengorn y Osman, 1996).

El TRH R1 exhibe especificidad estructural por las tres posiciones de los aminoácidos de la hormona; y, con excepción del derivado N-3-metil-His que posee una afinidad por el receptor mayor que la de la misma TRH, todas las modificaciones estructurales del péptido causan un decremento dramático en la afinidad de unión (Gershengorn y Osman, 1996). Desafortunadamente, ninguno de los cientos de análogos sintéticos de la TRH actúa como un antagonista clásico de los receptores. De hecho, los únicos competidores conocidos pertenecen a una clase completamente diferente de sustancias, las benzodiazepinas, aunque esta afinidad por el receptor se presenta solo *in vitro* (Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999).

Los estudios farmacológicos llevados a cabo con los análogos sintéticos de la TRH y con la TRH misma, muestran características indistinguibles de afinidad de todos los ligandos entre ambos receptores de la rata, aunque esto está en controversia para uno de ellos (O'Dowd, *et al* 2000; Cao, *et al*, 1998).

El TRH R1, en la pituitaria anterior, es regulado homóloga (Hinkle y Tashjian, 1975; Oron, *et al*, 1987) y heterológamente. Estos efectos han sido muy bien caracterizados tanto *in vitro* como *in vivo*.

La inactivación homóloga en particular, ha sido descrita para los dos tipos de receptores, y produce su rápida y extensiva internalización a través de vesículas cubiertas de clatrina. El 80% de los

complejos TRH-receptor son secuestrados dentro de las células de la pituitaria con una vida media de 2-3 minutos (Bauer, *et al*, 1999). En la región C terminal del TRH R1 existen tres secuencias consenso para fosforilación por la caseína cinasa II que permite al receptor interactuar con la  $\beta$  - arrestina (Hanyaloglu, *et al*, 2001; Kroeger, *et al*, 2001), y dirigirse hacia las vesículas de clatrina (Zhu, *et al*, 2002).

La capacidad de la TRH de inducir la hidrólisis del fosfoinosítido, en una estimulación aguda, es indistinguible tanto para el TRH R1 como para el TRH R2 de la rata. Ante la estimulación crónica, el TRH R2 es menos efectivo que el R1 en la inducción de la expresión génica, quizá debido a las diferencias en la velocidad de internalización y degradación inducida por la TRH. El TRH R2 es internalizado e inactivado más rápidamente que el R1 después de la unión con sus agonistas (O'Dowd, *et al*, 2000).

Una segunda fase de exposición a la TRH produce una disminución en la tasa de transcripción del gen del TRH R1 y un decremento en la estabilidad del RNAm (Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999). En células GH<sub>3</sub> transfectadas establemente con el DNAc del TRH R1, la vida media aparente de los transcritos del receptor disminuyó de 3 a 0.75 horas después de la estimulación con 1 $\mu$ M de TRH por 1.5 horas (Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999). La activación de la PKC por ésteres de forbol produce una reducción en la cantidad de RNA mensajero del TRH R1, de forma similar a la que se produce por regulación homóloga (Fujimoto, *et al*, 1991), por lo que se ha propuesto a esta vía como la mediadora de los efectos de la TRH, además de la PKA (Gershengorn y Osman, 1996).

Otras hormonas y factores regulan la densidad de receptores y los niveles de su RNAm: las hormonas tiroideas, en particular la T<sub>3</sub>, ejercen un poderoso control negativo sobre la respuesta de la pituitaria a TRH (Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999). Los estrógenos incrementan los cantidad de receptor, al igual que los glucocorticoides y el calcitrol; mientras que el factor de crecimiento epidermal, el péptido intestinal vasoactivo y todas las drogas que producen elevadas concentraciones de AMPc causan su disminución (Gershengorn, 1993; Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999).

Es importante señalar que el decremento en el número de receptores membranales (medidos por la unión de [<sup>3</sup>H]MeTRH) de la TRH), ya sea por regulación homóloga o heteróloga, disminuye la respuesta de la pituitaria a la hormona (Gershengorn, 1993).

El análisis del gen y su región promotora revelaron que, ni la caja TATA, la CAAT, o una región rica en GC están presentes en la cercanía del sitio de inicio de la transcripción (Iwasaki, *et al*, 1996; Bauer, *et al*, 1999), si bien se encontraron dentro de 1kb que flanquea al punto de inicio de transcripción, los siguientes elementos regulatorios: un sitio perfecto PEA-3, un motivo GATA, dos sitios casi perfectos Pit-1 (para un factor de transcripción específico de la pituitaria anterior), una secuencia muy similar al sitio consenso de AP1, dos sitios medios TRE casi perfectos, y una secuencia semejante GRE (Iwasaki, *et al*, 1996; Gershengorn y Osman, 1996; Bauer, *et al*, 1999). Estos datos ayudan a explicar mucha de la información bioquímica y molecular sobre la regulación del receptor 1 de la TRH.

En los últimos años ha surgido una gran cantidad de evidencia bioquímica y funcional que apoya la existencia de homo-, hetreo- y oligómeros entre los miembros de la familia receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (Kroeger, *et al*, 2001). Este tipo de interacciones ha sido demostrado para el TRH R1 en sistemas celulares *in vitro*, en donde, en un estado libre de ligando, el receptor existe como un complejo homo – oligomérico, siendo esta interacción incrementada por la TRH, en una forma dosis y tiempo dependiente (Kroeger, *et al*, 2001; Zhu, *et al*, 2002), lo que sugiere que este fenómeno tiene alguna relevancia funcional aún desconocida (Zhu, *et al*, 2002).

#### DISTRIBUCIÓN DEL SISTEMA DE TRANSMISIÓN TRHÉRGICO EN EL SNC

Los estudios de hibridación *in situ* del RNA mensajero del TRH han permitido caracterizar los sitios donde comienza la síntesis de la preprohormona, sin embargo, este enfoque no permite investigar dónde se encuentran las terminales nerviosas en las que se almacena y libera el péptido procesado (Bauer, *et al*, 1999).

Los estudios inmunocitoquímicos sobre la TRH han sido bastante infructuosos, primero por la dificultad que representa generar anticuerpos específicos y sensibles para un péptido de tamaño tan pequeño, y segundo, los problemas técnicos con respecto al método óptimo de fijación de los tejidos (Bauer, *et al*, 1999). Se ha intentado, con el objetivo de evitar la difusión y pérdida extensiva de la TRH, usar fuertes fijadores aldehídicos como la acroleína o la fijación a bajos valores de pH usando ácido pícrico que han tenido cierto éxito. De esta forma, se observa una gran cantidad de inervación TRHérgica en la eminencia media, el área preóptica y otras áreas hipotalámicas, además del núcleo del tracto solitario, el bulbo olfatorio, el septo lateral, el área amígdalohipocampal y la espina dorsal (Bauer,

*et al*, 1999). Sin embargo, se considera que esta información está incompleta y que se está subestimando la cantidad de inervaciones TRHérgicas en el SNC (Bauer, *et al*, 1999).

En el sistema límbico se pueden detectar células positivas a la TRH en las capas granular y la piramidales (CA1 Y CA3) y en los aspectos ventrales del giro dentado (Hökfelt, *et al*, 1989). En la corteza, las neuronas TRHérgicas están dispersas, siendo particularmente numerosas en las cortezas piriforme y entorrinal, alrededor del surco rinal (Hökfelt, 1989).

Con respecto a los receptores de la TRH no se conoce nada de su papel relativo en el cerebro, aunque hibridaciones *in situ* muestran patrones de distribución mutuamente excluyentes (Cao, *et al*, 1998; Heuer, *et al*, 2000).

Por muchos años, y antes de clonar e identificar a los dos tipos conocidos de TRH Rs, su distribución en el sistema nervioso central se estudió con base en autoradiografía cuantitativa, usando como ligando al análogo de alta especificidad [<sup>3</sup>H]MeTRH. El panorama que emergió con estos trabajos era el de una distribución heterogénea a lo largo de todas las estructuras cerebrales. Sharif y Burt (1985) reportan que el complejo amigdalario, el hipotálamo y el tálamo son las zonas más enriquecidas con receptor. Además, detectan señales de unión muy altas en el giro dentado de la formación hipocámpal, el septo medial, el núcleo accumbens y en la espina dorsal (sustancia gelatinosa, cuerno dorsal y materia gris del canal central) (Sharif y Burt, 1985).

En ese mismo año otras tres publicaciones muestran con más detalle la distribución de los sitios de unión a la TRH en el cerebro de la rata. Manaker, *et al* (1985) encuentran que las más altas concentraciones de receptores se encuentran en: el aparato olfatorio (específicamente en el bulbo olfatorio accesorio), la amígdala entera y las regiones adyacentes a ésta (como el núcleo endopiriforme y el área amigdalohipocámpal), zonas discretas dentro del hipocampo (la región ventral del subículo y del giro dentado), algunas estructuras corticales rienccefálicas localizadas sobre la amígdala y el hipocampo (corteza entorrinal y la que rodea a la fisura rinal) y el septo (donde resaltan el núcleo basal de la estria terminal, el núcleo septohipotalámico, los brazos horizontal y vertical de la banda diagonal de Broca y las islas de Calleja Mayor).

Densidades moderadas de sitios de unión a la TRH se pueden observar en algunas regiones del mesencéfalo (núcleo interpeduncular y colículos inferior y superior), el tallo cerebral (varios núcleos de la formación reticular como el rafe dorsal medial y el locus coeruleus), la espina dorsal (siendo la más alta concentración de receptores la de la sustancia gelatinosa, seguida de los cuernos dorsal y ventral y del canal central), el hipotálamo (los núcleos paraventricular, periventricular, arcuato, ventromedial,

dorsomedial, el área preóptica lateral y medial y el hipotálamo lateral, destacando el núcleo supraquiasmático con altas concentraciones de receptores) y el tálamo (donde destaca el núcleo paraventricular talámico con alta concentración) (Manaker, *et al*, 1985). Los niveles más bajos de receptores se encuentran en los ganglios basales, la neocorteza y el cerebelo. Contrasta el hecho de que en este reporte se detectan niveles muy bajos de receptor en el núcleo accumbens, mientras en el trabajo de Sharif y Burt (1985) ésta es una de las áreas con mayor densidad.

Mantyh y Hunt (1985) observan un patrón de distribución e intensidad de unión a los receptores similar al de Manaker, aunque con ligeras discrepancias en algunos núcleos amigdalares, talámicos e hipotalámicos. Pazos, *et al* (1985) reportan el mismo patrón general, aunque nuevamente se presentan contradicciones con los otros reportes en sitios muy específicos del SNC. En estos trabajos se resalta la ausencia total de correlación entre los sitios inmunoreactivos a TRH y los sitios de unión, aunque las dificultades técnicas de la inmunohistoquímica del TRH deben ser consideradas.

Recientemente se reportó la hibridación *in situ* para los cuatro elementos del sistema de transmisión TRHérgica (Heuer, *et al*, 2000). En general, la distribución del RNA mensajero de los dos receptores concuerda con la de la PPII, con ligeras discrepancias sobre todo en el cerebelo (Heuer, *et al*, 2000).

Más específicamente en la corteza cerebral hay abundante RNA mensajero del R2 que está colocalizado con el de la PPII en las cortezas cingulada, somatosensorial primaria, motora, visual y olfativa; mientras que el mensajero del R1 se encuentra en las áreas de transición corticales (cortezas perirhinal, entorhinal) (Heuer, *et al*, 2000).

Dentro de la formación hipocampal no se puede detectar el RNAm del R2, el de la PPII aparece muy abundante en las neuronas piramidales de CA1, CA2, y CA3/CA4 y el del R1, se encuentra en abundancia en el giro dentado ventral (Heuer, *et al*, 2000).

En la amígdala el mensajero del R1 es abundante en el complejo nuclear corticomediale (la zona de transición con el hipocampo) y se sabe que a esta zona llegan fibras desde regiones que contienen la TRH, como el bulbo olfatorio, el hipotálamo y los núcleos viscerales del tallo cerebral, por lo que se propone que el TRH R1 media las funciones viscerales de la TRH en la amígdala. El mensajero del R2 abunda en las subdivisiones rostral medial y basolateral de la amígdala (al igual que la TRH), las cuales son zonas que reciben estímulo cortical y talámico, quizá modulando funciones cognitivas asociadas a los aspectos emocionales de la atención y el aprendizaje. El RNAm de la PPII se distribuye en todo el complejo amigdalareo con distintas intensidades (Heuer, *et al*, 2000).

El hipotálamo contiene abundante RNAm de la preproTRH, del R1, de la PPII y, en menores cantidades, del R2. Aquí, el patrón de distribución muestra mutua exclusividad entre los dos receptores. En el tálamo el TRH R2 es el receptor predominante, mientras la PPII se expresa en bajas cantidades. El tálamo es una región conocida por ser relevo de las señales de dolor, y dado que contiene gran cantidad de TRH R2, es este receptor el que podría contribuir a la actividad antinociceptiva de la TRH ante estímulos químicos y mecánicos, con una potencia analgésica comparable con la de la morfina (Heuer, *et al*, 2000).

La presencia del TRH R2 en la formación reticular, en el tálamo, en las regiones corticales y en la amígdala basolateral, arroja pistas sobre la actividad de la TRH en el efecto de despertar a los animales hibernantes, reducir el tiempo de sueño de los animales bajo narcosis inducida por etanol,  $\beta$ -endorfina, barbitúricos, etc., además de sus propiedades antidepresoras. Esta capacidad analéptica está relacionada con la acetilcolina, la cual, en respuesta a la TRH, incrementa su liberación en la corteza y el hipocampo (Heuer, *et al*, 2000; Cao, *et al*, 1998; O'Dowd, *et al*, 2000).

El R2 es el receptor predominante en el tallo cerebral y en el mesencéfalo, sobre todo en zonas involucradas en el procesamiento de la información sensorial y la regulación de la actividad, la conciencia y el sueño. El R1 en cambio, está restringido a unas pocas áreas en las que están localizadas motoneuronas involucradas en controlar funciones neuroendócrinas y vegetativas (Heuer, *et al*, 2000).

Existe abundante mensajero del R2 en la corteza cerebelar, al igual que de la PPII, no se detectan los RNA mensajeros del R1 ni de la preproTRH. Esta estructura coordina el movimiento, y la localización del R2 y la PPII en ella explica algunas evidencias experimentales, como mejoría, inducida por análogos de la TRH, de desórdenes cerebrales (Heuer, *et al*, 2000; Horita, 1998). La presencia de RNAm del R2 en el cerebelo pareciera estar contrapuesto a la ausencia de señal de unión de [ $^3$ H]McTRH en esta zona (Manaker, *et al*, 1985).

En la espina dorsal el mensajero del R2 predomina en la materia gris del cuerno dorsal (que lleva información sensorial al cerebro), mientras que el R1 predomina en zonas ventrales de motoneuronas.

## EFFECTOS DE LA TRH EXTRAHIPOTALÁMICA

La participación de la TRH como neuromodulador se ha apoyado en estudios farmacológicos, en los que la inyección intravenosa o intracerebroventricular del péptido o de sus análogos induce cambios conductuales en animales y en humanos.

La administración de la TRH disminuye el consumo de agua y alimento (Vijayan, *et al*, 1977), induce la activación del sistema locomotor (en el núcleo accumbens) (Metcalf y Dettmar, 1981) y de la conducta de masticación y olfateo (Yamamura, *et al*, 1991), tiene un efecto termorregulador (induce hipo e hipertermia dependiendo de la especie), mejora el tono muscular (antagoniza la relajación inducida), tiene efectos cardiovasculares (incrementa la presión sanguínea y el ritmo cardiaco), incrementa la tasa respiratoria, incrementa o decrece, dependiendo de la especie, la motilidad gástrica e incrementa la secreción de ácidos y el vaciamiento gástrico (O'Leary y O'Connor, 1995). También produce un efecto de excitación (Thompson y Rosen, 2000).

Los análogos de la TRH con modificaciones C-terminales han mostrado incrementar la recuperación de daños en la espina dorsal, mientras que los modificados en el extremo N-terminal no pueden revertir estos daños (Heuer, *et al*, 2000; Cao, *et al*, 1998), y en cambio muestran actividad neuroprotectora en zonas involucradas con la actividad motora y aspectos cognitivos (Cao, *et al*, 1998).

La TRH ha sido implicada en desórdenes afectivos como la depresión (Prange, *et al*, 1987; Nemeroff, *et al*, 1989) y en algunas patologías como la epilepsia, en las que reduce la intensidad de las convulsiones (Ujihara, *et al*, 1991; Matsumoto, *et al*, 1987) y potencia la acción anticonvulsiva del fenobarbital sobre las crisis generalizadas producidas por electrochoques (Nemeroff, *et al*, 1975). También revierte los efectos narcóticos e hipotérmicos de la inyección intraperitoneal de etanol y la narcosis de los barbitúricos (Morzorati, *et al*, 1993; French, *et al*, 1993), o bien de animales sometidos al frío (Zoeller y Rudeen, 1992).

La inyección intratecal de la hormona induce castaño de las mandíbulas y "wet dog shakes", mientras que en el cuarto ventrículo incrementa la tasa respiratoria (Rekling, 1992).

En las neuronas corticales y del hipocampo la TRH antagoniza la excitación producida por el glutamato (Renaud, *et al*, 1979; Koenig, *et al*, 1996), mostrando un efecto neuroprotector contra eventos de excitotoxicidad (Pizzi, *et al*, 1999; Shishido, *et al*, 1999). Por sí misma la hormona no cambia el potencial de membrana en reposo, pero incrementa las respuestas despolarizantes del NMDA (*N* - metil - D - aspartato) en la sinapsis entre la vía perforante y el giro dentado (Morimoto, *et al*, 1986), siendo éste un efecto a largo plazo (Kasparov, *et al*, 1994). No se ha encontrado efecto directo sobre los niveles de calcio, pero inhibe su incremento causado por estimulación con NMDA o AMPA (ácido  $\alpha$  - amino 3 - hidroxil - 5 - metil - isoxazol - 4 - propiónico) (Koenig, *et al*, 1996).

En neuronas CA1 hipocámpales la TRH (10mM) incrementa fuertemente la respuesta a NMDA de forma transitoria (6-7 min) y a nivel postsináptico (Stocca y Nistri, 1995). Kasparov, *et al* (1994) y

Stocca y Nistri (1995) proponen que el mecanismo para el efecto de la TRH sobre las células piramidales CA1 sea a través de sus receptores.

La TRH también interactúa con la transmisión GABAérgica (del ácido  $\gamma$  - amino butírico) produciendo una depresión reversible de los potenciales inhibitorios postsinápticos rápidos mediados por GABA<sub>A</sub> (Stocca y Nistri, 1996; Barbieri y Nistri, 1997; Crews, *et al*, 1996).

Se ha postulado que la actividad de los receptores NMDA y GABA<sub>A</sub>, está siendo modulada por fosforilación mediada por la proteína cinasa C (PKC), ya que: a) los receptores NMDA y GABA<sub>A</sub> presentan sitios potenciales de fosforilación por la PKC (Stocca y Nistri, 1996) y, b) los efectos neuroprotectores del TRH se revierten al inhibir a la PKC (Pizzi, *et al*, 1999; Shishido, *et al*, 1999).

Estudios con modelos animales que ejemplifican condiciones estresantes como el ayuno (de Gortari, *et al*, 2000a; Nikodemova, *et al*, 1998) y el kindling amigdalino (epilepsia), así como la administración de etanol, han permitido comprometer al péptido con conductas y alteraciones del SNC e identificar los sitios de acción endógena, al evaluar los cambios específicos en el contenido de la TRH en regiones cerebrales relacionadas con la patología o función en estudio (Sattin, *et al*, 1999).

El ayuno (privación total de alimento) y la desnutrición (déficit crónico del consumo energético-proteico), provocan cambios en el contenido de la TRH en la amígdala (de Gortari, *et al*, 2000a), (región relacionada con la selección de nutrimentos y funciones sensoriales) y en la región septohipocampal (Nikodemova, *et al*, 1998) (involucrada en aprendizaje y memoria). En animales recién destetados las alteraciones aparecieron en el hipocampo y en el núcleo accumbens, coincidiendo con la hiperactividad observada en éstos (de Gortari, *et al*, 2000a).

La activación de las neuronas TRHérgicas ha sido demostrada en modelos animales de epilepsia; por ejemplo, con la estimulación eléctrica subumbral ("kindling") (Knoblach y Kubek, 1997; Kubek, *et al*, 1993; de Gortari, *et al*, 1995) y durante los ataques inducidos por kainato o pilocarpina (Jaworska-Feil, *et al*, 1999), en los cuales la TRH y su RNA mensajero se incrementan en el hipocampo, la amígdala y la corteza frontal, mientras que la unión de TRH (receptores) disminuye (de igual forma que el RNAm del TRH R2, de Gortari, *et al*, 2002, sometido). Los niveles de TRH incrementan proporcionalmente a la frecuencia de descarga conforme el "kindling" progresa y en relación a la susceptibilidad epileptogénica de cada región (de Gortari, *et al*, 1998).

Las dosis elevadas de etanol administradas en forma aguda provocan alteraciones en funciones biológicas y en regiones cerebrales donde la TRH está presente. La inyección intraperitoneal de etanol induce hipotermia (Zoeller y Rudeen, 1992) 1 y 3 horas después de su administración y reduce el

incremento en los niveles de RNAm de la preproTRH del NPV que resulta de someter a los animales al estímulo de frío (Zoeller y Rudeen 1992; Uribe, *et al*, 1995). El etanol y la TRH actúan a través de vías interrelacionadas, pues la hormona bloquea los efectos narcóticos del etanol y los dos están involucrados en la termogénesis. En el núcleo accumbens hay una disminución inicial en el contenido de TRH una hora después de la inyección (cuando el animal está narcotizado) mientras que, en el hipocampo los niveles de TRH están incrementados, regresando a niveles control 24 horas después (de Gortari, *et al*, 2000b)

Los datos anteriores permiten proponer que si las neuronas TRHérgicas son activadas, esto estará reflejado en cambios en el RNAm de la preproTRH y, algunas veces, en los niveles de péptido procesado (Uribe, *et al*, 1995; Pérez Martínez, *et al*, 1998; Joseph-Bravo, *et al*, 1998), y/o en los niveles de receptores o la actividad de la PPII (Charli, *et al*, 1998).

En los últimos años se ha centrado la atención en el papel potencial de los neuropéptidos en el aprendizaje y la memoria (de Wied, 1997; Bennett, *et al*, 1997), aunque la mayoría de la evidencia que los implica en los procesos cognitivos proviene de la manipulación farmacológica de animales en el contexto de un paradigma de aprendizaje y/o de memoria.

Varios neuropéptidos parecen facilitar o producir cambios conductuales que mejoran el desempeño cognitivo; entre ellos se encuentran la vasopresina, la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la somatostatina, la sustancia P, el neuropéptido Y y la misma TRH (Bennett, *et al*, 1997).

La administración oral o nasal de análogos de la TRH, produce un decremento en el número de errores y en el tiempo de solución de una tarea específica (Horita, 1998), y ha resultado benéfica en modelos animales de amnesia (Horita, 1998), así como en la prevención de defectos mnemónicos causados por lesiones en el cerebro frontal basal (Yamamura, *et al*, 1991) o en el núcleo basal magnocelular (Miyamoto, *et al*, 1993; Ogasawara, *et al*, 1995; 1996; Sabbatini, *et al*, 1998; Panocka, *et al*, 1997), así como daños producidos por la administración de escopolamina (Yamamura, *et al*, 1991; Drago, *et al*, 1996; Miyamoto, *et al*, 1993), electrochoques (Swertka, *et al*, 1992), hipercapnia (Ogasawara, *et al*, 1995) o lesiones inducidas por AMPA (Ballard, *et al*, 1996).

Algunos de estos efectos se deben a las acciones de la TRH sobre los sistemas de transmisión colinérgica ya que los análogos de la TRH son capaces de restaurar a las neuronas colinérgicas del núcleo basal magnocelular (NBM) y a las proyecciones colinérgicas hacia la corteza cerebral afectadas por lesiones en el NBM (Panocka, *et al*, 1997; Sabbatini, *et al*, 1998); aunque algunas evidencias hacen

pensar que el efecto facilitador de la TRH en los paradigmas de retención y recuperación también puede estar mediado por los receptores a NMDA (Kasparov y Chizh, 1992).

## LA ESTRATEGIA DE OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

Los oligodeoxinucleótidos (ODNs) antisentido son moléculas de longitud corta (17-22 nucleótidos) que interfieren con uno o más pasos del proceso de formación de una proteína, generando tejidos deficientes en ésta, lo cual permite entender la relevancia fisiológica de cualquier factor a partir de su ausencia (Neumann 1997, Leslie, *et al.* 1999). El uso de ODNs antisentido ha resultado ser una herramienta valiosa para estudiar, en el cerebro intacto, los correlatos moleculares, celulares y neuroendócrinos del comportamiento (Landgraf, *et al.* 1997), específicamente de neuropéptidos en paradigmas fisiológicos y conductuales específicos (Neumann, 1997).

El interés en la utilización de los ODNs antisentido se centra en que pueden, teóricamente, abatir una enfermedad cuando ésta es producto de la sobre expresión de una proteína específica (Neumann, 1997; Leslie, *et al.* 1999).

La técnica aún está siendo perfeccionada, aunque algunas de sus limitaciones han sido la causa del desánimo entre investigadores sobre el potencial terapéutico y experimental de los ODNs antisentido. Conforme la experiencia va aumentando y más estudios sobre los mecanismos, toxicidades y empleo de controles adecuados han sido publicados, el éxito de la técnica se ha incrementado (Neumann, 1997; Leslie, *et al.* 1999), sobre todo por su simplicidad, diseño racional, bajo costo y por los avances en la secuenciación de genomas (Agrawal y Kandimalla, 2000).

Las estrategias teóricas para reducir específicamente el nivel de expresión a través de los ODNs antisentido han estado enfocadas en lo siguiente: inducir la formación de una estructura de triple hélice en el material genético de una célula, o por la unión de un ODN en forma antisentido al DNA durante la transcripción, inhibiendo, de cualquier forma, la formación del RNA mensajero (Leslie, *et al.* 1999).

Alternativamente, los ODNs antisentido van dirigidos contra el RNA mensajero para impedir su traducción a proteína; en este caso puede detenerse el proceso de traducción por un impedimento estérico en la interacción de las enzimas que usualmente reconocen el RNA de cadena sencilla, lo que puede llevar a que la molécula no sea procesada de la forma correcta, no sea transportada fuera del núcleo o no sea traducida (Landgraf, *et al.* 1997). El rompimiento del RNAm por la actividad de la RNasa H endógena también ha mostrado estar involucrado en muchos casos (Leslie, *et al.* 1999). La RNasa H es una enzima que rompe la cadena de RNAm en el sitio de hibridación con un ODN

antisentido y aparentemente es la que media el efecto antisentido en general (Lebedeva y Stein, 2001). Las actividades de RNasa H han sido caracterizadas en mamíferos; incluso se tienen identificados estos genes en el humano. La actividad de RNasa H podría estar involucrada en la remoción de los iniciadores de RNA en la síntesis de DNA, tal como lo sugieren datos *in vitro* para procariontes y eucariontes. Sin embargo, su papel fisiológico en *E. coli* es prevenir que la replicación del material genético inicie en un sitio diferente a *oriC*, ya que la eliminación de los iniciadores se realiza por la actividad de exonucleasa 5' de la polimerasa de DNA. La trascendencia fisiológica de la RNasa H en eucariontes permanece incomprendida (ten Asbroek, *et al*, 2002).

El diseño de los ODNs es crítico, sin embargo, no existen reglas. Por ejemplo, la determinación del tamaño óptimo de la molécula se ha hecho por medios empíricos para cada caso específico (Patzel, *et al*, 1999); aún así, algunas generalidades deben ser consideradas, como el hecho de que el ODN no debe ser tan corto como para no tener una capacidad de unión específica y, no demasiado largo como para que no sea accesible al tejido y sea difícil de manipular (Patzel, *et al*, 1999).

La eficacia de los ODNs antisentido está relacionada a la termodinámica y a los parámetros cinéticos determinados por las secuencias blanco locales y la propia estructura espacial del ODN. Sin embargo, estos parámetros de hibridación no son lo suficientemente claros, pues la extensión o disminución de uno o dos nucleótidos en un ODN altera crucialmente la eficiencia de apareamiento tanto *in vitro* como *in vivo* (Patzel, *et al*, 1999).

La selección de una secuencia para la hibridación con el ODN antisentido es simple en teoría, ya que solo estaría basada en el apareamiento de bases clásico de Watson y Crick. Sin embargo, sólo el 20 ó 30 % de las secuencias seleccionadas son lo suficientemente activas para reducir los niveles de proteína hasta un 50% (Landgraf, *et al*, 1997). Las regiones más comúnmente seleccionadas de un RNAm incluyen la región 5' no traducida, la 3' y la región alrededor del codón de inicio de la traducción. De estos sitios, los ODNs dirigidos contra el AUG han sido los más consistentes en la reducción de la expresión génica, sin embargo, éste no es el único sitio en el que se produce un efecto antisentido, ni en el que ocurre más potentemente y a veces resulta ineficaz. Además, debido a que algunas de las secuencias de nucleótidos alrededor del AUG están conservadas hasta cierto punto, otros RNAm pueden resultar afectados por los ODNs antisentido (Landgraf, *et al*, 1997; Patzel, *et al*, 1999).

Las estrategias que toman en cuenta el contenido de GC o la temperatura de disociación del heterodúplex, y los programas de plegamiento de RNA, han producido resultados mixtos. Se ha determinado que algunas estructuras secundarias del RNAm son sitios accesibles para el apareamiento,

por ejemplo: los tallos - asa (stem – loop), cuando el asa tiene una extensión mínima de 10 nucleótidos; las burbujas (regiones no complementarias flanqueadas por segmentos apareados) de tamaño similar; las secuencias que conectan unidades de plegamiento y las secuencias de los extremos no involucradas en interacciones intramoleculares. Con estas bases se generó un algoritmo computacional que predice las estructuras secundarias más probables de una secuencia en particular de RNA (Mfold) (Patzel, *et al*, 1999), donde las regiones susceptibles de hibridación con ODNs antisentido son aquéllas con un arreglo estructural de cualquier tipo a los ya mencionados, y que mantengan dicho arreglo a lo largo de todas las estructuras de energía mínima del RNAm. Los trabajos en los que se utiliza este método reportan ODNs antisentido muy efectivos en la zona de inicio de la traducción, aunque también en otros sitios del RNAm (Patzel, *et al*, 1999).

Para que los ODNs antisentido puedan tener el efecto deseado, es necesario protegerlos de las nucleasas endógenas que trabajan rápidamente para degradarlos. Los ODNs fosfodiéster son altamente susceptibles a las nucleasas celulares, con una vida media en el suero de 20 minutos; se han llevado a cabo experimentos exitosos con esta clase de moléculas, aunque las dosis de aplicación requeridas son altas y frecuentes (Peng Ho y Harting, 1999). Wahlestedt, *et al* (1993) reportan la disminución de la expresión del receptor NMDA R1 en neuronas en cultivo e *in vivo*, con el empleo de antisentidos fosfodiéster; en otros trabajos estos ODNs no tienen efecto (Broberger, *et al*, 2000).

Frecuentemente se emplean ODNs fosforotionados (en los que uno de los oxígenos que no participan en el enlace fosfodiéster es sustituido por un átomo de azufre) debido a su estabilidad relativa frente a las nucleasas (Landgraf, *et al*, 1997). Hay evidencia de alta toxicidad en el sistema nervioso central (como pérdida de neuronas e infiltración de células) y efectos secundarios no deseados, como fiebres, inducción de mediadores de la inflamación, síntomas generales de mala salud y pérdida de peso con la aplicación de ODNs fosforotionados (Brogerger, *et al*, 2000; Peng Ho, *et al*, 1998). Si bien muchos de estos efectos son resultado de la presencia de ciertos motivos de secuencia y estructuras secundarias, más que de efectos debidos a la tioprotección (Agrawal y Kandimalla, 2000). Por ejemplo, los motivos CpG (o los de 4 G en serie) en la secuencia de un ODN tienen actividad inmunoestimuladora, por lo que se debe tener mucha precaución para la interpretación de los datos *in vivo*. También, las estructuras secundarias producidas por auto complementariedad del ODN antisentido, interfieren con el efecto específico principalmente por el reclutamiento de proteínas que no son las blanco, como las proteínas que se unen a heparina (Agrawal y Kandimalla, 2000; Lebedeva y Stein, 2001). Así, en el diseño de los ODNs conviene evitar tales secuencias.

Los ODNs fosforotionados parecen ejercer sus efectos antisentido a través de una potente inducción de la RNasa H, aunque la efectividad está ligeramente afectada por la reducida afinidad a los sitios de unión (Lok, *et al*, 2002). Otro tipo de ODNs antisentido, con modificaciones 2-metoxiribonucleótido, son efectivos cuando son complementarios a la secuencia de inicio de la traducción, sugiriendo que detienen este proceso (Peng Ho, *et al*, 1998).

Una alternativa estructural que permite dar la protección deseada la representan los ODNs quiméricos, los cuales consisten en la combinación de nucleótidos 2'-metoxifosfodiéster y fosforotionados. Estos ODNs retienen la habilidad de activar a la RNasa H, dado que poseen una secuencia corta de nucleótidos fosforotionados, al mismo tiempo que presentan menor toxicidad por este mismo tipo de residuos (Peng Ho, *et al*, 1998). Otro tipo de ODNs quiméricos son los que poseen un esqueleto central fosfodiéster, flanqueado en los extremos por 3 nucleótidos fosforotionados, que parecen no presentar los efectos tóxicos mientras que conservan la capacidad de activar a la RNasa H y tienen una afinidad mayor por la molécula blanco de RNAm (Landgraf, *et al*, 1997).

Un aspecto crítico en la activación de la RNasa H es que no requiere complementariedad total entre el ODN y el RNAm para la inducción de su actividad. Este efecto ha sido llamado rompimiento "irrelevante" y parece incrementarse con la longitud del ODN si bien, la concentración y la química del esqueleto también son factores importantes en este aspecto (Lebedeva y Stein, 2001).

Una vez que los ODNs antisentido han sido seleccionados, considerando todos los aspectos anteriores, deben realizarse experimentos *in vitro* para demostrar su eficacia, verificar la especificidad de los efectos y seleccionar los más potentes para los experimentos en animales (Peng Ho y Harting, 1999).

Los mecanismos por los cuales una célula es capaz de tomar a los ODNs antisentido están pobremente caracterizados; se ha sugerido que su endocitosis está mediada por proteínas de unión a ácidos nucleicos (Neumann, 1997). Una de las metas principales en el desarrollo de esta tecnología es por tanto, delinear la distribución y comportamiento farmacocinético del ODN, así como desarrollar los medios más efectivos para la administración de la molécula al citoplasma de las neuronas o de cualquier tipo celular *in vivo* (Landgraf, *et al*, 1997) considerando que los ODNs no tienen la misma eficiencia de entrada en todos los tipos celulares. Para el tratamiento de las células en cultivo se hace necesario el empleo de lípidos catiónicos, y otros reactivos de transfección comerciales (Braasch y Corey, 2002).

El uso de los controles apropiados es uno de los principios aspectos de la técnica de antisentido. Así, para poder distinguir los efectos tóxicos de los específicos, el requerimiento mínimo es tener

grupos tratados con el vehículo (o agente transfectante) y con un ODN de secuencia aleatoria (Landgraf, *et al*, 1997). Otros de los ODNs control más socorridos son los que tienen la secuencia sentido, que resultan muy sencillos de diseñar y tienen la ventaja, al igual que los aleatorios, de conservar la misma composición de bases que el ODN antisentido.

Un control biológico importante es el medir, en el mismo grupo de células tratadas con el antisentido, alguna otra proteína o su RNAm, siempre y cuando exista alguna relación química o biológica con la molécula que se intenta disminuir (Landgraf, *et al*, 1997). La aplicación del conjunto de estos controles permite que los efectos reportados sean más convincentes (Landgraf, *et al*, 1997).

En teoría, los efectos máximos de un ODN antisentido se logran después de un tratamiento por un tiempo tres veces mayor que la vida media de la proteína, y en general, los receptores con 7 dominios transmembranales como los de la TRH, tienen una vida media de 2 hasta 8 días (Peng Ho y Harting, 1999). En particular, en las células de la línea GH3, la vida media del TRH R1 es de aproximadamente 12 horas, mientras que en ovocitos de *Xenopus* transfectados con este mRNA, de 3 horas (Oron, *et al*, 1987). Esto se desconoce para los dos receptores *in vivo*.

Finalmente, cabe mencionar que ya se ha reportado la aplicación de ODNs antisentido en moléculas involucradas en la transmisión TRHérgica, algunos de estos reportes son resumidos en la tabla siguiente:

Blanco	Tipo ODN	Control	Efecto	Observaciones
TRH R1	Fosforotariado complementario a las primeras 18 bases después del AUG. (5' GAC GGT TTC ATT CTC CAT 3')	Mismatch (con 4 errores)	Previene el efecto estimulador del TRH en el vaciado del intestino y el efecto del frío en la estimulación del mismo fenómeno. Esto es mediado por las vías colinérgicas vagales. El ODN control no tiene efectos.	Aplicado intracisternalmente (Martínez, <i>et al</i> , 1998).
TRH R1	El mismo que en Martínez, <i>et al</i> , (1998).	El mismo que en Martínez, <i>et al</i> , (1998).	En respuesta al frío, el ODN antisentido contra el TRH R1 no altera la inducción de cFos en el NPV, el núcleo supra óptico, ni en varios núcleos medulares. El control induce una disminución de cFos en el área postrema y el núcleo motor del vago, lo que explican como efecto de la variabilidad biológica y del pequeño tamaño de la muestra.	Reportado en Martínez, <i>et al</i> , 2001).

TRH	Fosforotionato dirigido contra una región de 23 bases (de la 20 a la 42) después del codón de inicio (5' AAC CAA GGT CCC GGC ATC CTG GA 3').	Sentido	La inyección intracerebroventricular del ODN reduce el contenido de TRH diencefálica y la presión sanguínea sistólica, además de una reducción de la angiotensina II diencefálica. El control no tiene efecto.	(García, <i>et al.</i> , 2001)
TRH	RNA antisentido de la preproTRH, producido por transfección estable de células en cultivo con un adenovirus.	Adenovirus expresando a la $\beta$ -galactosidasa.	Disminución del 90% en la producción de la TRH, cambios en la morfología neuronal después de 14 días de la transfección. Se supone que la ausencia del péptido produce muerte neuronal.	El efecto morfológico es parcialmente revertido por la administración de TRH exógena. (Luo, <i>et al.</i> , 2001)

## JUSTIFICACIÓN

El papel de la TRH extra hipotalámica ha comenzado a elucidarse con la inyección de análogos sintéticos resistentes a la degradación o con concentraciones muy altas del péptido natural, sin embargo, las funciones endógenas de la hormona aún no son claras. La participación de las neuronas TRHérgicas en el sistema límbico se infiere de cambios observados en el metabolismo de la TRH en distintas regiones que dependen del paradigma en estudio. Por ejemplo, en el modelo de ansiedad los niveles de la TRH y su RNAm cambian en amígdala, mientras que en el laberinto de agua (aprendizaje y memoria) en hipocampo.

Para definir cómo participa la TRH en estas conductas se requeriría poder anular su efecto utilizando, por ejemplo, antagonistas específicos para los receptores; éstos no existen y su desarrollo es complejo, estando fuera del alcance económico de muchos laboratorios. En su lugar, las herramientas de la biología molecular permiten el diseño de drogas (oligodeoxinucleótidos) que reducen, selectivamente, la expresión de proteínas permitiendo obtener información relevante sobre la función.

En comparación a la construcción de transgénicos, los ODNs antisentido, aunque no puedan ser usados en estudios de sobreexpresión, presentan las ventajas de ser efectivos para cualquier especie, su aplicación y efecto son tejido específicos, muestran reversibilidad de la disminución de la proteína blanco, su desarrollo tiene un costo relativamente bajo y un uso terapéutico potencial (Landgraf, *et al*, 1997, Leslie, *et al* 1999). Si bien presentan algunas desventajas como la disminución incompleta de la proteína blanco, efectos independientes de la secuencia, problemas de administración al sistema nervioso central y cierta toxicidad asociada a los ODNs fosforotacionados, estos problemas no parecen ser generales, y las optimizaciones *in vitro*, además de la utilización de los controles adecuados, permiten la selección de los oligodeoxinucleótidos más específicos y eficientes.

## OBJETIVOS

### ▪ GENERAL

El propósito de este proyecto es optimizar *in vitro* un método basado en el empleo de ODNs antisentido que permita, posteriormente, interferir con la transmisión TRHérgica en un sitio preciso del sistema límbico en el cerebro de la rata adulta.

### ▪ PARTICULARES

- Diseño de 3 ODNs antisentido para cada uno de los RNA mensajeros blanco: el de la preproTRH y los de sus dos receptores (TRH R1 y R2), mediante el método publicado por Patzel, *et al* (1999).
- Selección del ODN antisentido más efectivo en la disminución inducida del RNA mensajero del TRH R1 en el sistema de cultivo de células de la pituitaria anterior de ratas hembra adultas
- Determinación de la especificidad del efecto antisentido por medición de RNA mensajeros distintos (controles internos) y por el uso de ODNs sentido y/o de secuencia aleatoria.
- Comparar la potencia del efecto antisentido entre los ODN diseñados para el TRH R1 y el ODN reportado para el RNAm de este gen (Martínez, *et al* 1998).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### DISEÑO DE LOS OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS ANTISENTIDO

La estrategia de diseño de los ODN fue la siguiente:

Se obtuvo del banco de genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) la secuencia del RNA mensajero, para los tres genes de interés de *Rattus norvegicus*.

Un segmento de 400 nucleótidos (ver resultados) del extremo 5' de esas secuencias se copió al programa Mfold, el cual modela la estructura secundaria del RNAm, permitiendo identificar los dominios susceptibles de ser blancos de las secuencias antisentido. Se obtuvieron las 9 conformaciones más probables para el mRNA del TRH, 16 para el de TRH - R1 y 18 para el de TRH R2.

Se buscaron regiones accesibles para los ODNs en y cerca del sitio de inicio de la traducción en las conformaciones de mayor y menor energía obtenidas. Estas secuencias fueron comparadas contra el banco de genes por medio del algoritmo de alineamiento BLAST (el cual contiene información de 81.2% del genoma de la rata noruega), en busca de posibles blancos no deseados. Las secuencias que presentaron alineamientos problemáticos fueron sustituidas.

Después de evaluar que las secuencias de interés no tuvieran regiones de secuencia semejantes a las del resto del genoma secuenciado de *Rattus norvegicus*, los ODNs antisentido seleccionados fueron sometidos a un análisis con el programa Oligo v.4.0, para probar su estabilidad en la hibridación con sí mismo y la formación de estructuras de tipo horquilla.

Los ODNs seleccionados (de 20 nucleótidos de longitud), más sus controles, fueron sintetizados por la compañía Synthetic Genetics con la modificación de fosforotioato en la secuencia completa de los ODNs (San Diego, USA) y purificados a través de HPLC, por la misma compañía.

### CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS DE PITUITARIA ANTERIOR

Para los cultivos primarios de adenohipófisis se emplearon ratas hembra de la cepa Wistar de 80 a 100 días de edad, mantenidas en condiciones controladas de luz y alimentadas *ad libitum* (Purina rat chow).

El protocolo de cultivo que se siguió es el reportado por Vargas, *et al* (1994). Después de sacrificar a las ratas por decapitación, la pituitaria anterior fue disectada y separada de la neurohipófisis. Quince adenohipófisis fueron colocadas en 3 ml de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

(DMEM), que contenía 0.3% (p/v) de albúmina sérica bovina (DMEM – BSA), y lavadas 3 veces con el mismo.

Posteriormente, el tejido fue cortado en pedazos con una navaja estéril y lavado otras tres veces con DMEM – BSA, después de lo cual el medio fue retirado y los segmentos fueron sometidos a disgregación enzimática en una solución de tripsina (5mg/ml) en DMEM - BSA (3ml) por 18 minutos a 37°C y en agitación. Luego, se añadieron 12 µg de DNasa disueltos en 4.5ml de DMEM – BSA, y la incubación continuó por 2 minutos más en las mismas condiciones. Transcurridos los 2 minutos finales, la solución conteniendo a la tripsina y la DNasa fue retirada, se adicionaron 2 ml de DMEM – BSA con 1.5 mg de inhibidor de tripsina y se incubó por 8 minutos a 37°C en agitación. El inhibidor fue retirado y, por 8 minutos, se incubó al tejido a 37°C en agitación en 6 ml de DMEM libre de calcio y magnesio, con 2mM de EDTA. Nuevamente, el sobrenadante fue retirado y se adicionaron 6 ml de DMEM, ahora con solo 1mM de EDTA, incubándose a 37°C por 15 min.

Para la dispersión mecánica, las células fueron lavadas tres veces con 3 ml de solución C [NaCl (1.7gr/l), KCl (0.1gr/l), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.035gr/l), glucosa (0.25gr/l), NaHCO<sub>3</sub> (0.55gr/l), BSA (0.28% [p/v]), antibiótico antimicótico (0.25% [v/v]) y rojo de fenol (2.5mg/l)] y pasadas a través de pipetas Pasteur con 4 puntas de distintos diámetros. Las células fueron colocadas en 25 ml de DMEM – BSA con 2.7µg/ml de DNasa y centrifugadas a 200 g por 10 minutos a temperatura ambiente. La pastilla con las células fue resuspendida en 15 ml de DMEM suplementado (suero bovino fetal al 10%, vitaminas 1.1% [v/v], penicilina 50U/ml, estreptomycin 50µg/ml, fungosina 125ng/ml, glutamina 2mM, y glucosa 14mM) y las células fueron contadas, a través de un hematocitómetro, obteniéndose el número total de células mediante la siguiente fórmula:

número de células/µl = (número de células vivas) (factor de dilución) (K) / número de cuadros contados; donde el factor de dilución es 2, K es 4000 y el número de cuadros es 800.

Una vez contadas, las células fueron sembradas a una densidad de  $1.1 \times 10^6$  en pozos de 16 mm de diámetro y a  $0.18 \times 10^6$  en pozos de 6.4 mm (en este caso el DMEM contenía la glucosa, las vitaminas, la glutamina, la estreptomycin, la fungosina y la penicilina en las concentraciones mencionadas).

Las células sembradas en pozos de 16 mm fueron mantenidas 3 días en cultivo a 37°C en una atmósfera saturada con agua al 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>. Al tercer día se les hizo cambio de medio y se les dejó por un día más; al quinto se realizó la transfección. Las células sembradas en pozos de 6.4

mm se mantuvieron por 24 horas *in vitro*, después de lo cual fueron tratadas con los ODNs sin transfectante.

## TRANSFECCIONES

Para la aplicación de los ODNs antisentido para el TRH R1 a células adenohipofisarias en cultivo, se empleó como transfectante al FuGENE6™ (Roche). Este reactivo se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$ , por lo que se recomienda calentarlo a temperatura ambiente 10 a 15 minutos antes de su uso, además de mezclarlo por vórtex. Todo el proceso se realizó en condiciones estériles, dentro de una campana de flujo horizontal.

El protocolo general de transfección (Hellgren, *et al*, 2000) es el siguiente: se emplearon 12  $\mu\text{l}$  del reactivo de transfección para el tratamiento de  $1.1 \times 10^6$  células de adenohipófisis sembradas en pozos de 16 mm de diámetro, mantenidas 4 días *in vitro*. Con esa densidad celular, los 12  $\mu\text{l}$  de FuGEN6 fueron disueltos en 93  $\mu\text{l}$  de DMEM (suplementado con vitaminas 1.1% [v/v], glutamina 2mM y glucosa 14 mM) y agitados suavemente por vórtex. A esta mezcla se le añadió la cantidad de DNA necesaria para tener las concentraciones deseadas de cada ODN antisentido y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, los ODNs más el FuGENE fueron adicionados a las células en cultivo que fueron previamente lavadas con PBS (KCl 2.68mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.44mM, NaCl 138.89mM y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.06 mM) y se adicionó el volumen restante de DMEM para completar 0.5 ml de volumen final. Las células fueron mantenidas con el ODN y el transfectante por 4 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ , transcurridas las cuales el medio con el transfectante fue retirado y se añadió 1 ml del medio con el que fueron sembradas.

## EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL (Chomczynski y Sacchi, 1987)

Las células en cultivo se lavan con PBS o solución de Hank, sobre hielo ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se homogenizan en 400  $\mu\text{l}$  de solución D (4M tiocianato de guanidina, 0.5% de sarcosil, 1M  $\beta$ -mercaptoetanol, 0.026M citrato de sodio pH 7.2). El homogenizado es puesto en un tubo de microcentrífuga, se le añaden 40  $\mu\text{l}$  de acetato de sodio 2M pH 4.0, se agita por vórtex y se le adiciona 1 $\mu\text{l}$  de RNA de transferencia (1mg/ml).

La mezcla es mantenida a  $4^{\circ}\text{C}$  y se agregan 400  $\mu\text{l}$  de fenol saturado con agua, para posteriormente agitarlo vigorosamente. A lo anterior se le agregan 80  $\mu\text{l}$  de cloroformo - alcohol

isoamílico (49:1) y se agita durante 1 minuto. Después, se deja reposando en hielo (4°C) por 15 minutos, para más tarde centrifugar (también a 4°C) por 17 minutos a 14500 g.

Se toma el sobrenadante y se mezcla, siempre a 4°C, con 450 µl de isopropanol. A partir de aquí se siguieron 2 formas de precipitación del RNA; la primera consistió en mantener la mezcla por 7 segundos en nitrógeno líquido, procediendo a una centrifugación a 4°C a 14500 g por 17 minutos. El sobrenadante es desechado y la pastilla es lavada con etanol frío al 70%. Después, se centrifuga nuevamente a 4°C, a 14500g por 15 minutos. Finalmente, el sobrenadante es desechado, el sedimento se deja secando a temperatura ambiente entre 5 y 10 minutos y el RNA se resuspende en 13 µl de agua DEPC (esta forma de extracción se usó cuando se partió de  $0.36 \times 10^6$  células de adenohipófisis).

La segunda forma de precipitación consiste en centrifugar, con el isopropanol, a 4°C a 14500 g por 22 minutos, se desecha el sobrenadante y se resuspende el sedimento en 300 µl de isopropanol y 300 µl de solución D. Esta mezcla se deja incubando a -20°C toda la noche. Al día siguiente se centrifuga a 4°C a 14500 g por 22 minutos, y al sedimento resultante se le añaden 400 µl de etanol frío al 70%, se agita y se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones pero sólo por 15 minutos. Transcurrido el tiempo de centrifugación, la pastilla es secada igual que en la primer forma de precipitación y resuspendida en el mismo volumen de agua DEPC.

## CUANTIFICACIÓN DEL RNA

Se toma 1 µl del RNA resuspendido y se disuelve en 99 µl de agua estéril grado de cultivo. Esta solución es colocada en una celda de cuarzo de 1 ml y se mide la densidad óptica de la solución con luz ultravioleta a 260nm. La concentración del RNA se calcula mediante la fórmula:

$$\frac{(\text{densidad óptica}) (\text{factor de dilución}) (40)}{1000}$$

## RT-PCR

Del RNA extraído y cuantificado, se toma 1 µg para la transcripción reversa. El RNA se lleva a un volumen final de 12 µl con agua DEPC y, por separado, se prepara la mezcla de reacción: 8.9 µl de agua DEPC, 6 µl de buffer de transcripción 5X, 3 µl de DTT (0.1M), 0.6 µl de solución de desoxiribonucleótidos (10mM), 1 µl de solución de oligodeóxinucleótido de timinas (0.5µM) y 0.5µl de la enzima transcriptasa reversa (200 U/µl).

Antes de agregarle la mezcla de reacción, el RNA se somete por 5 minutos a 65°C y luego se coloca otros 5 minutos en hielo, para después añadirle la mezcla de reacción (20µl), centrifugarlo e incubarlo a 37° por 2 horas en flotación.

Por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron los siguientes DNAc en las condiciones que para cada uno se describen:

Para el del TRH R1 se diseñaron los oligos sentido (5' ACCCAGAGAAGCAGGCAGAGTGACA3') y antisentido (5'GATCCGCCACAGCCAGACTCACCAG3') de forma que generen un producto de 350 nucleótidos de longitud y se optimizaron las condiciones de amplificación: 3µl de DNAc y una concentración final de los oligonucleótidos de 2 ng/µl; se hace una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, luego 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 94°C, 1 minuto de hibridación (alineamiento) a 58°C y 2 minutos de amplificación a 72°C. Se da una extensión final de 15 minutos a 72°C.

Estas mismas condiciones también funcionan para la amplificación de 984 bases del DNAc de la gliceraldehído 3 – fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la cual se utiliza como control interno. Los oligodeoxinucleótidos para este último DNAc se emplean a una concentración final de 0.3ng/µl (sentido, 5'TGAAGGTTCGGTGTCAACGGATTTGGC3'; antisentido, 5'CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC3').

Además, se amplificó otro control interno, la ciclofilina (Muller, *et al*, 1998), para la cual se emplea 1µl de DNAc y los oligodeoxinucleótidos siguientes: sentido 5'GGGGAGAAAGGATTTGGATA3' y antisentido 5'ACATGATTGCCATCCAGCA3', a una concentración final de 1 pmol/µl. Las condiciones de PCR son 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto; lo anterior se repite por 25 ciclos y se da una extensión final de 5 minutos a 72°C, lo que produce una banda de 348nt..

También se adoptó como control de especificidad para las células de la pituitaria anterior, al receptor 1 de la hormona liberadora de corticotropina (CRH R1) (Baigent y Lowry, 2000). Para éste se emplea 1µl de DNAc, y los siguientes oligodeoxinucleótidos a una concentración final 0.5µM: sentido 5'TCCACTACATCTGAGACCATTCAGTACA3', antisentido 5'TCCTGCCACCGGCGCCACCTCTTCCGGA3'. Las condiciones de PCR son: desnaturalización a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 63°C y 2 minutos a 72°C, una extensión final e 8 minutos a 72°C.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo con la siguiente mezcla: agua DEPC (volumen variable de acuerdo a la cantidad de DNAC, requiriéndose completar 39  $\mu$ l), 5 $\mu$ l de buffer 10X, 2.5 $\mu$ l  $MgCl_2$  30mM, 1 $\mu$ l de deoxinucleótidos fosfato 10mM, 1 $\mu$ l de cada uno de los oligonucleótidos sentido y antisentido (para quedar a las concentraciones finales requeridas) y 0.5 $\mu$ l de Taq polimerasa de DNA 5 U/ $\mu$ l. Las PCRs se llevaron a cabo en el Robocycler (Stratagen) o en el Mastercycler (Eppendorf). De los productos de PCR se tomaron 10  $\mu$ l y se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (3%) por aproximadamente 40 minutos a 100 volts. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se analizó en un multianalizador de imágenes (Fluor-S Multimager). La migración de los productos de la PCR se comparó con la de marcadores de peso molecular en el rango de 2176-154 nt.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias entre los tratamientos y sus respectivos controles fueron determinadas a través del análisis de varianza (ANOVA) de una vía; en los casos donde la p resultó significativa ( $p < 0.05$ ) se realizó la prueba Post-Hoc de Duncan en la que una  $p < 0.05$  fue considerada significativa. Los datos analizados son una media de tres o cuatro platos por experimento.

## RESULTADOS

### DISEÑO DE LOS ODNs ANTISENTIDO

La estructura de los RNAm de los tres genes cuya expresión se desea reducir específicamente, fue analizada mediante una serie de predicciones teóricas de estructura secundaria, obtenidas mediante el programa *mfold*, para determinar los motivos estructurales accesibles para hibridación con los ODNs antisentido (Patzel, *et al*, 1999). Se obtuvieron las secuencias de los RNA mensajeros de la preproTRH (Lechan, *et al*, 1986), el TRH R1 (de la Peña, *et al*, 1992) y el TRH R2 (Cao, *et al*, 1998) de la rata albina (*Rattus norvegicus*) localizadas en el banco de genes del NCBI. El número de acceso de estas secuencias es: NM 013016 para el mensajero de la preproTRH (corresponde a un segmento de 768 nucleótidos (nt), que comprende al marco abierto de lectura completo para la preprohormona, ubicándose el codón de inicio de la traducción en la posición 1 y el de paro en la posición 768). NM 01347 para el RNAm del TRH R1 (3279 nt de longitud, con el AUG en la posición 268 y el codón de término de la traducción en el 1506). AF 091715 para el TRH R2 (abarca 1641 nt, siendo 362 y 1420 las posiciones límite del marco abierto de lectura).

Para la predicción de las estructuras secundarias sólo se ocuparon 400 nt de cada secuencia: 1 – 400 de la preproTRH, 1 – 400 del TRH R1 y 301 – 700 del TRH R2, correspondientes a la sección que codifica para el N terminal de las proteínas, más un segmento 5' no traducido en el caso de los receptores. Estas secuencias se sometieron a modelación de estructura secundaria a través del algoritmo *mfold*. El algoritmo predijo 9 estructuras energéticamente favorables para el segmento del RNAm de la preproTRH (Figura 1), 16 para el mensajero del TRH R1 (Figura 2) y 18 para el del TRH R2 (Figura 3). En cada una de las estructuras predichas se buscaron dos secuencias que presentaran motivos de los que parecen ser accesibles para la hibridación con ODNs cercanas al sitio de inicio de la traducción, y que mantuviesen su estructura más o menos conservada en todas las predicciones energéticamente favorables generadas por el algoritmo (Patzel, *et al*, 1999) (Figuras 1 a 3). Se escogió además, para cada gen, una secuencia que abarcara al sitio de inicio de la traducción ya que muchos trabajos lo emplean consistentemente para inducir, por medio de ODNs antisentido, una potente inhibición en la expresión génica (Landgraf, *et al*, 1997). Las secuencias seleccionadas son de 20 nt de longitud. En total, para cada gen se tenían 2 regiones factibles de hibridación antisentido y una en el inicio de la traducción si bien, 3 parece ser una muestra muy reducida como para obtener una secuencia que en la práctica resultara accesible, el hecho de haber elegido dos de ellas con base en los resultados de *mfold*, incrementa la probabilidad de encontrar una adecuada para el objetivo del proyecto (Patzel, *et al*, 1999).

Las secuencias de los blancos elegidas son las siguientes:

- para la preproTRH:
  - 5' AUG CCG GGA CCU UGG UUG CU 3' (1 – 20)
  - 5' GAU CUU CAC CCU AAC UGG UA 3' (36 – 55)
  - 5' GAA UCC UGC GCC UUG CCG GA 3' (61 – 80)
- para el TRH R1:
  - 5' GCC ACU GAA GAU GGA GAA UG 3' (258 – 277)
  - 5' AAA CCG UCA GUG AAC UGA AC 3' (278 – 297)
  - 5' AAA CCG AGC UCC CGC CGC AA 3' (299 – 318)
- para el TRH R2:
  - 5' CAC CAG CAA GAU GGA UGG CC 3' (352 – 471)
  - 5' GUA AUG UCU CGC UCA UUC AC 3' (375 – 394)
  - 5' CAA GGU GGU CUC AGU CUU CC 3' (424 – 443).

Con el objeto de reducir la posibilidad de que las secuencias escogidas no fuesen exclusivas a los genes de interés, se empleó la herramienta básica de alineamiento local (BLAST) mediante la cual se buscó en todo el banco de genes (en el cual está incluido el 81.2% del genoma de la rata noruega) a aquéllos con segmentos idénticos a los preseleccionados, y que pudieran afectarse en el proceso de tratamiento con un ODN antisentido ya que no se requiere la hibridación completa de un ODN para inducir la actividad de la RNasa H y generar rompimientos “irrelevantes” (Lebadeva y Stein, 2002). Los resultados obtenidos fueron positivos para todas las secuencias, excepto para la número 3 del TRH R1 la cual tenía una región de 15 nt de identidad con el RNAm del sindecano 1 (proteína núcleo del proteoglicano heparán sulfato), por lo que fue descartada.

Los alineamientos obtenidos a través del BLAST para la secuencias complementarias a los 9 ODNs definitivos (cuya secuencia se anota en la siguiente página) se resumen a continuación:

- TRH-1: 20 alineamientos significativos, 5 de ellos de rata (del gene de la TRH).
- TRH-2: 35 alineamientos significativos, 5 de rata (del gene de la TRH).
- TRH-3: 32 alineamientos significativos, 5 de rata (del gene de la TRH).
- TRHR1-1: 153 alineamientos significativos, 5 de rata (del gene del TRH R1).
- TRHR1-2: 39 alineamientos significativos, 7 de rata (del gene del TRH R1).
- TRHR1-3: 16 alineamientos significativos, 7 de rata (del gene del TRH R1).

- TRHR2-1: 147 alineamientos significativos, 3 de rata (del gene del TRH R2).
- TRHR1-2: 29 alineamientos significativos, 3 de rata (del gene del TRH R2).
- TRHR1-3: 80 alineamientos significativos, 3 de rata (del gene del TRH R2).

Los alineamientos con genes de rata se presentan en el anexo 1.

Para el resto de las preselecciones se prosiguió el proceso de evaluación cuyo paso siguiente es la obtención de la secuencia antisentido complementaria y su análisis, a través del programa Oligo v.4.0, para indagar la posible formación de estructuras secundarias en los ODNs por auto complementariedad o por la presencia de palíndromes. Los datos que produjo el programa fueron satisfactorios para todos los ODNs, menos para el complementario a la tercer secuencia de la preproTRH, éste fue descartado. Se buscaron alternativas para las dos secuencias descartadas (los resultados del BLAST y del programa Oligo v.4.0 para las secuencias finales seleccionadas, incluyendo las dos que sustituyen a las eliminadas, se muestran en los anexos 1 y 2 respectivamente).

Finalmente, todas las secuencias de los ODNs seleccionados fueron sintetizadas por la compañía Synthetic Genetics con un esqueleto de DNA modificado mediante la sustitución de uno de los oxígenos del grupo fosfato que no participa en el enlace fosfodiéster, por un átomo de azufre (fosforotionados); ésto reduce la degradación por nucleasas e incrementa la activación de la RNasa H al formarse el heterodúplex con el RNA mensajero si bien, se presenta una reducción en la afinidad de unión comparado a los ODNs con esqueleto fosfodiéster (Lok, *et al*, 2002).

Secuencias de los ODNs antisentido seleccionadas para cada RNAm:

- preproTRH (Figura 1):
  - 5' AGC AAC CAA GGT CCC GGC AT 3' (TRH – 1)
  - 5' TAC CAG TTA GGG TGA AGA TG 3' (TRH – 2)
  - 5' CAC AAG AAT CGA CGT TCT GG 3' (TRH – 3)
- TRH R1 (Figura 2):
  - 5' CAT TCT CCA TCT TCA GTG GC 3' (TRHR1 – 1)
  - 5' GTT CAG TTG ACT GAC GGT TT 3' (TRHR1 – 2)
  - 5' CGG CTA CTT GCG GCG GGA GC 3' (TRHR1 – 3)
- TRH R2 (Figura 3):
  - 5' GGC CAT CCA TCT TGC TGG TG 3' (TRHR2 – 1)
  - 5' GTG AAT GAG CGA GAC ATT AC 3' (TRHR2 – 2)
  - 5' GGA AGA CTG AGA CCA CCT TG 3 (TRHR2 – 3)

Se ha reportado el uso de un ODN de 18 nt de longitud complementario a las primeras 18 bases del marco abierto de lectura del RNAm del TRH R1 (Martínez, *et al.* 1998; 2001), que se empleó para comparar su potencia relativa con la de los diseños realizados para el TRH R1. La secuencia de este ODN es la siguiente (Figura 2):

5' GAC GGT TTC ATT CTC CAT 3' (TRHR1 – 4).

Finalmente, antes de iniciar los ensayos *in vitro* para los ODNs fue necesario escoger un control de especificidad del efecto de los antisentido; para cada gen se utilizó un ODN control correspondiente a la secuencia sentido de los ODNs con la etiqueta “- 1” (TRH – 1, TRHR1-1 y TRHR2-1):

5' ATG CCG GGA CCT TGG TTG CT 3' (STRH)

5' GCC ACT GAA GAT GGA GAA TG 3' (STRHR1)

5' CAC CAG CAA GAT GGA TGG CC 3' (STRHR2).

El uso de controles sentido cuenta con la ventaja de su facilidad de diseño, además de que conserva una composición y distribución de bases similar a la del antisentido (Landgraf, *et al.*, 1997).

#### ENSAYOS CON LOS ODNs DEL TRH R1

Los ODNs antisentido del TRH R1 se probaron en células adhipofisarias en cultivo primario, donde se expresa una gran cantidad de este receptor, midiéndose los efectos de cada ODN mediante RT PCR (ver Materiales y Método). En general, las células se mantuvieron en cultivo por 4 días, siendo transfectadas con los ODNs al quinto (usando el reactivo FuGENE6), y cosechadas a los tiempos específicos de cada experimento (postransfección). Las transfecciones se hicieron en forma escalonada para poder cosechar al mismo tiempo todas las células después de transcurridos los lapsos postransfección.

La primer prueba antisentido consistió en la aplicación de los cuatro ODNs a las concentraciones de 1 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 5 $\mu$ M y 10 $\mu$ M (Figura 4), evaluando el efecto a las 12 horas postransfección. El ODN TRHR1-1 mostró, desde la concentración más baja (1 $\mu$ M), un efecto muy marcado en la reducción de los niveles de RNAm del R1, disminuyéndolo un 61%, semejante al efecto de doble dosis (2 $\mu$ M), (Figura 4A).

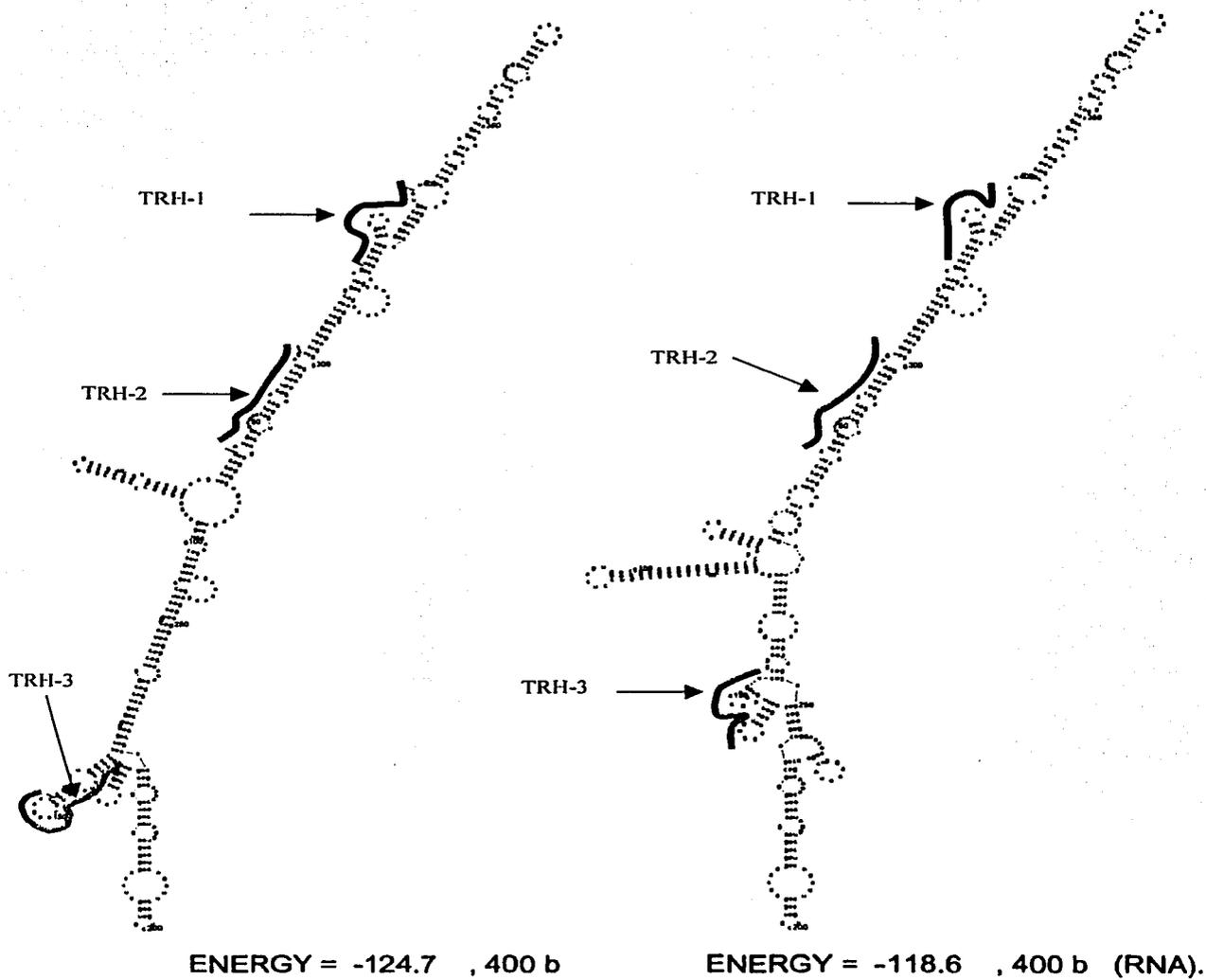
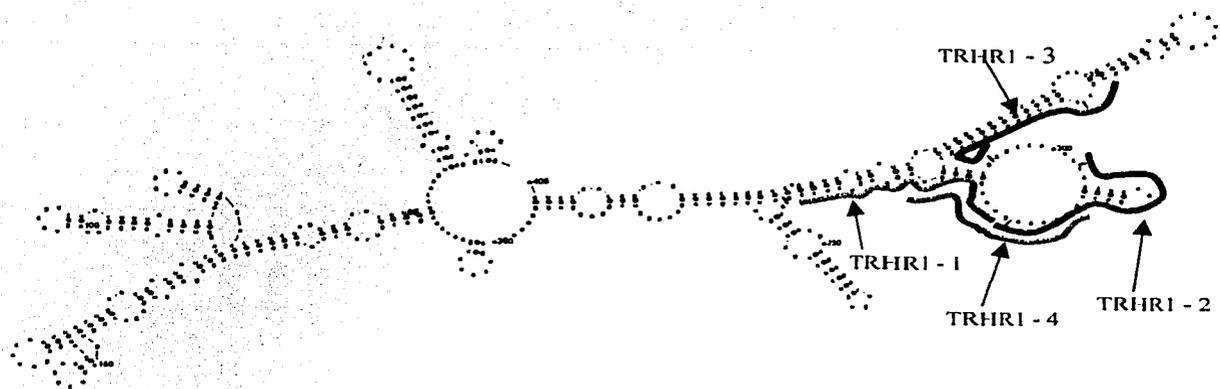
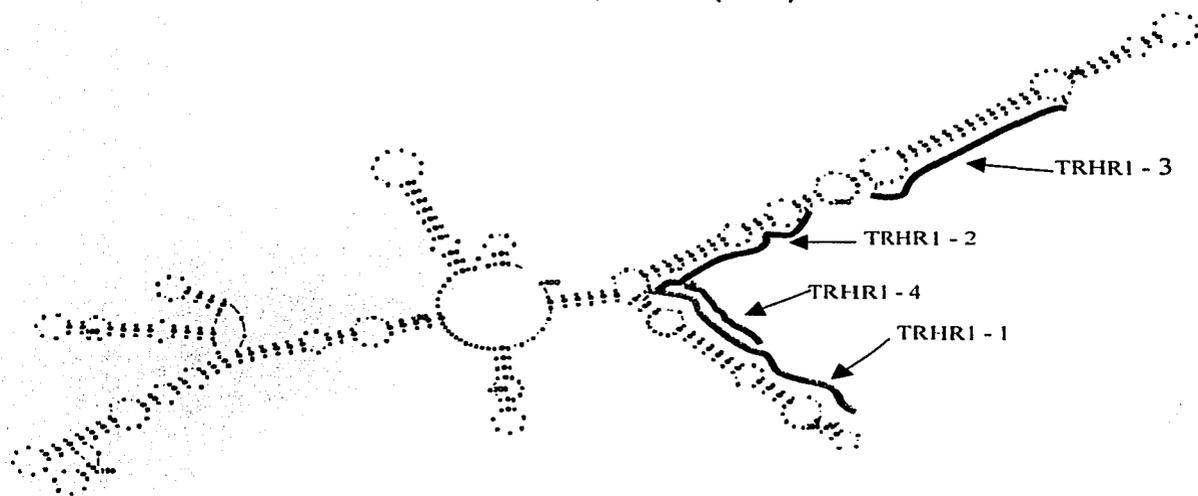


Figura 1. Predicciones de estructura secundaria de 400 nt del RNAm de la preproTRH obtenidas a partir del algoritmo *mfold*. Se emplearon los nucleótidos del 1 al 400 de la secuencia del RNAm de la preproTRH, con número de acceso NM013016 en el NCBI. Se presentan las estructuras de más alta (derecha) y más baja (izquierda) energía predichas. Las líneas representan la ubicación de los sitios de hibridación de los ODNs antisentido. b=bases.



ENERGY = -99.2 , 400 b (RNA).



ENERGY = -103.8 , 400 b (RNA).

Figura 2. Predicciones de estructura secundaria de 400nt del RNAm del TRHR1 obtenidas a partir del algoritmo mfold. Se emplearon los nucleótidos 1 a 400 de la secuencia del RNAm del TRHR1, con número de acceso NM01347 en el NCBI. Se presentan las estructuras de más alta (parte superior) y más baja (parte inferior) energía predichas. Las líneas representan la ubicación de los sitios de hibridación de los ODNs antisentido, b=bases.

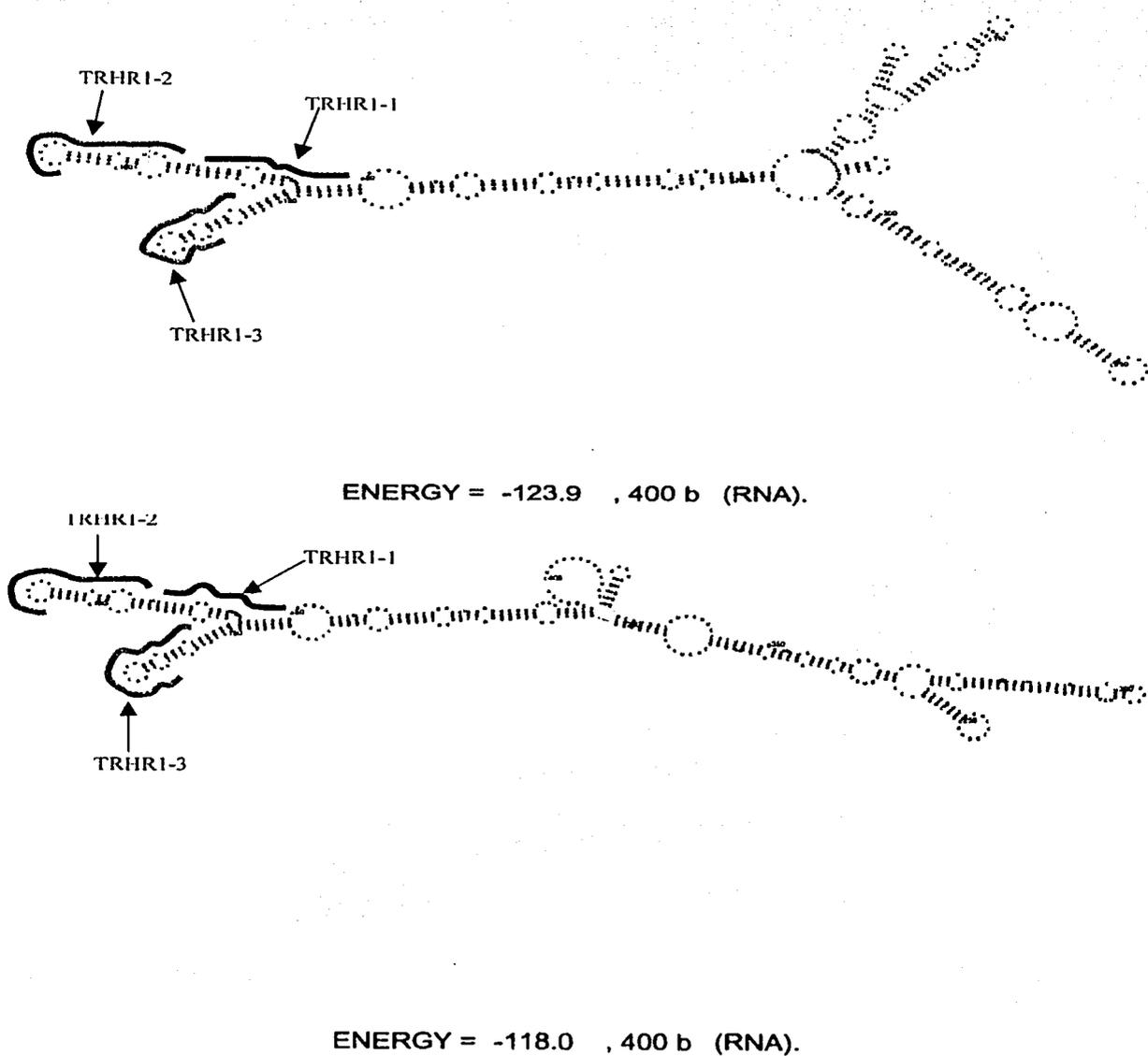


Figura 3. Predicciones de estructura secundaria de 400nt del RNAm del TRII R2 obtenidas a partir del algoritmo mfold. Se emplearon los nucleótidos 301 al 700 del RNAm del TRII R2 con número de acceso AF191715 en el NCBI. Se presentan las estructuras de más baja (parte superior) y más alta (parte inferior) energía predichas. Las líneas representan la ubicación de los sitios de hibridación de los ODNs antisentido. b=bases.

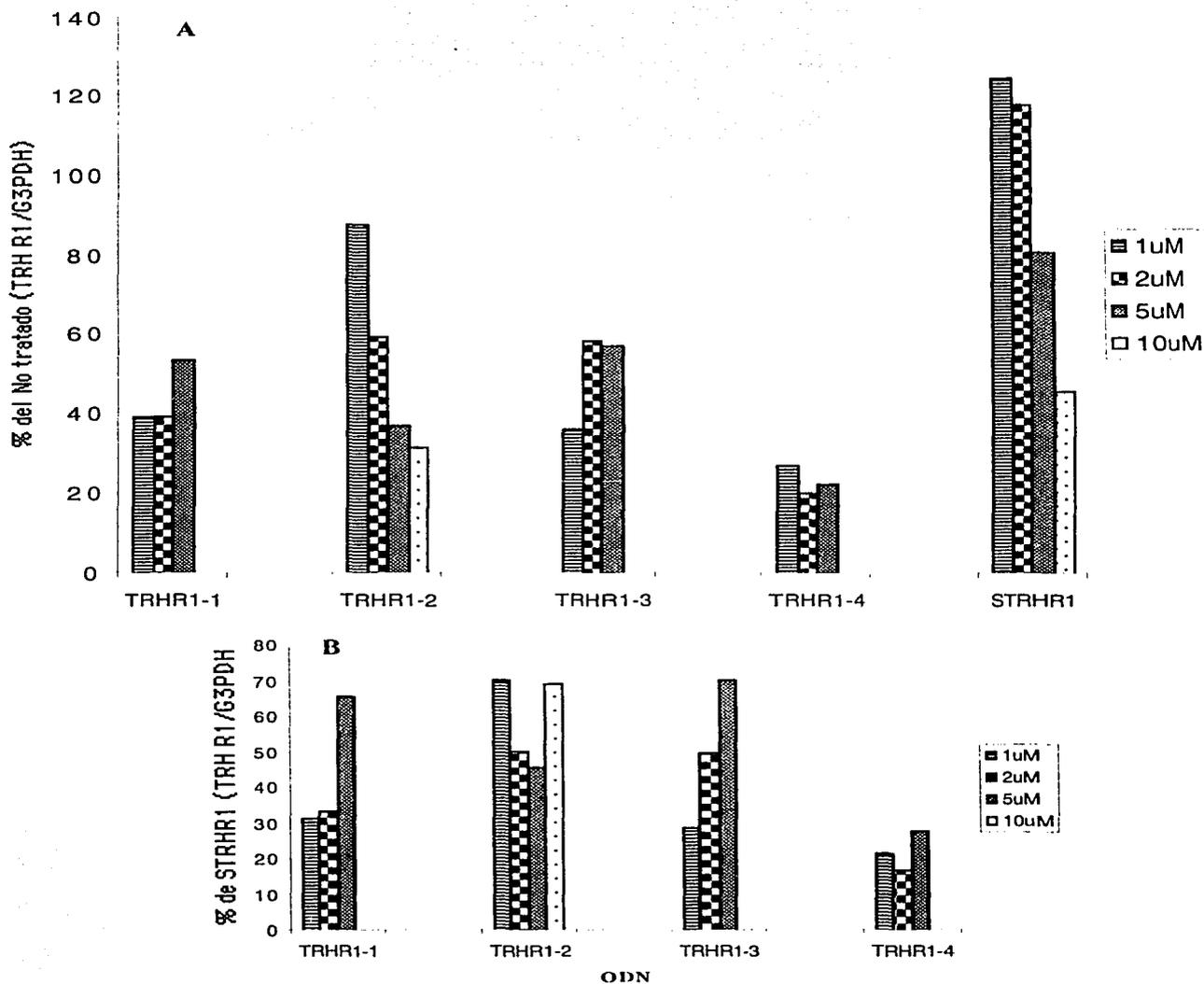


Figura 4. Efecto de los ODNs antisentido contra el *TRHR1* en los niveles de su *RNA* en células hipofisarias. Los ODNs se aplicaron a las dosis indicadas a las células adenohipofisarias en cultivo, midiéndose los *RNA* mensajeros del *TRHR1* y de la *G3PDH* (control interno) a las 12 horas postransfección. En A, se muestran el efecto de cada ODN a diferentes dosis, comparados con un control sin tratamiento, cosechado al mismo tiempo que el resto. En B se muestran los mismos tratamientos, pero cada barra está referida al tratamiento con el ODN STRHR1 a la dosis correspondiente, haciéndose énfasis en el efecto del ODN STRHR1 sobre el *RNA* del gene del receptor a las dosis de 5 y 10  $\mu$ M.

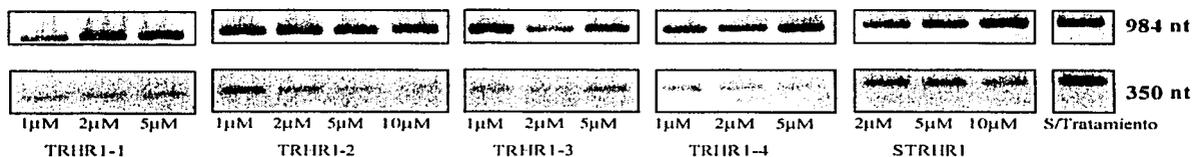


Figura 5. Electroforesis en gel de los productos de RT-PCR de los tratamientos antisentido. La figura muestra los segmentos amplificados de los RNAm de la G3PDH (984 nt) y del TRH R1 (350 nt) de los tratamientos de la figura 5. La dosis y el ODN empleado están indicados debajo de cada carril. Los productos del RT-PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y escaneados mediante el Fluor-S Manager.

La dosis más alta mostrada para este ODN es 5μM, cuyo efecto es, paradójicamente, menor que las concentraciones más bajas (solo 47% de inhibición, figura 4A) (dado el bajo número repeticiones, los datos pudieran ser artificiosos). Cabe señalar que el control de STRHR1 correspondiente a esta dosis mostró una inhibición marcada, de 20%, en comparación al control absoluto (células sin tratamiento alguno) (Figura 4A) o de 35% en relación a la dosis menor (1μM) del mismo ODN sentido (no mostrado), por lo que el efecto de cualquier ODN a esta dosis comparado con el STRHR1 apareció menos potente (Figura 4B), que si normalizamos todos los datos con respecto al control sin tratamiento (Figuras 4A).

El ODN TRHR1-4 es el que tuvo el efecto más marcado en la reducción de los niveles de mensajero del TRH R1 desde la concentración más baja, donde la expresión es de solo 26.9% con respecto al control sin tratamiento (Figura 4A). Este efecto es similar al de 2μM, en la que el RNAm está a 20.14% del mismo control y a 5μM (22.3% del control sin tratamiento, figura 4A).

Los ODNs TRHR1-2 y -3 produjeron disminuciones menos marcadas. Sin embargo, el TRHR1-2 presentó, comparado al control sin tratamiento, una clara curva de dosis-respuesta ya que a 1μM sólo redujo la expresión en un 13%, mientras que a 2μM un 41%, a 5μM 64% y a 10μM el efecto fue de 69% (Figura 4A), lo cual no se aprecia comparado al STRHR1 a 10μM (Figura 4B), pues en este caso, tal como se mencionó antes, los niveles del RNAm del R1 también estaban reducidos.

En la figura 5 se muestra la fotografía del gel de la electroforesis por medio del cual se analizó el efecto de los ODNs antisentido. La imagen nos permite apreciar que la G3PDH se mantiene más o menos constante a lo largo de los tratamientos, por lo que las variaciones que resultan al obtener el cociente TRH R1 / G3PDH son el resultado de efectos sobre el RNA mensajero del R1, y no de un efecto generalizado que podría estarse manifestando también sobre el RNAm de la G3PDH.

Del experimento anterior se desprendió que los ODNs con mejor efecto antisentido son el TRHR1-1 y el TRHR1-4. Para verificar que las respuestas observadas fuesen reproducibles, se decidió probar el efecto de estos ODNs a una concentración de 2 $\mu$ M en un experimento con tres platos por tratamiento. Además, para la elección del ODN más efectivo, resultaba fundamental averiguar cuál era la cinética del efecto antisentido para cada uno, por lo que se midieron los niveles del RNAm del R1 a 1, 3, 6, 12 y 24 horas postransfección (Figura 6). Estos tratamientos mostraron que el ODN TRHR1-4 (Martinez, *et al*, 1998; 2001) mantiene reducidos los niveles del RNAm del R1 desde la primer hora postransfección (35.5% del control absoluto) hasta las 12 horas (20.18 $\pm$ 19.4% del control absoluto), de forma consistente con el primer experimento, y que resultó ser el momento en el que tiene el efecto antisentido más importante (80.8% de reducción) (Figura 6B). La disminución fue paulatina entre las mediciones de 1 y 12 horas, siendo 67.5% a las 3 y 75.2% a las 6 horas, para posteriormente mostrar una recuperación parcial en la cantidad de RNAm a las 24 horas (65.8 $\pm$ 12.2% del control); si bien cierta inhibición aún estaba presente (38%) (Figura 6B); el ANOVA para este grupo de tratamientos más los grupos STRHR1 y sin tratamiento resultó significativa ( $p < 0.05$ ) y el análisis por medio de la prueba de Duncan reveló cuales fueron las comparaciones significativas entre los grupos. Los tratamientos a las 3, 6 y 12 horas resultaron estadísticamente diferentes de los grupos control (STRHR1 y sin tratamiento), sin que entre ellos exista diferencia, por lo que la disminución se mantiene igual hasta las 12 horas de tratamiento con el TRHR1-4 (Figura 6B).

El ODN TRHR1-1 mostró un efecto menor que el TRHR1-4 a la primera y tercera horas postransfección (71.2 $\pm$ 13.7 y 76.4% del control sin tratamiento, respectivamente) y una repentina reducción en el RNAm, de gran potencia, a las 6 horas (16.05 $\pm$ 8.6% del grupo sin tratamiento), con una fuerte recuperación a las 12 horas (101.2%). El efecto del tratamiento a las 6 horas es el único que resultó estadísticamente diferente de los controles y de los grupos de 1 y 12 horas (Figura 6A), aunque resulta contradictorio con los resultados del primer experimento; sin embargo, en este último punto, la variabilidad del efecto es alta (Figura 6A), y los tratamientos en el experimento 1 eran pocos como para poder concluir acerca del efecto de los ODNs a las 12 horas postransfección. A pesar de estas inconveniencias, es notorio que la reducción mostrada por el ODN TRHR1 - 1a las 6 horas, es de la dimensión que muestra el TRHR1 - 4 (Figura 6A). Al igual que en experimento anterior, todos los cambios en el cociente TRH R1/ G3PDH se deben a un efecto sobre los niveles del R1, tal como se puede apreciar en la figura 9.

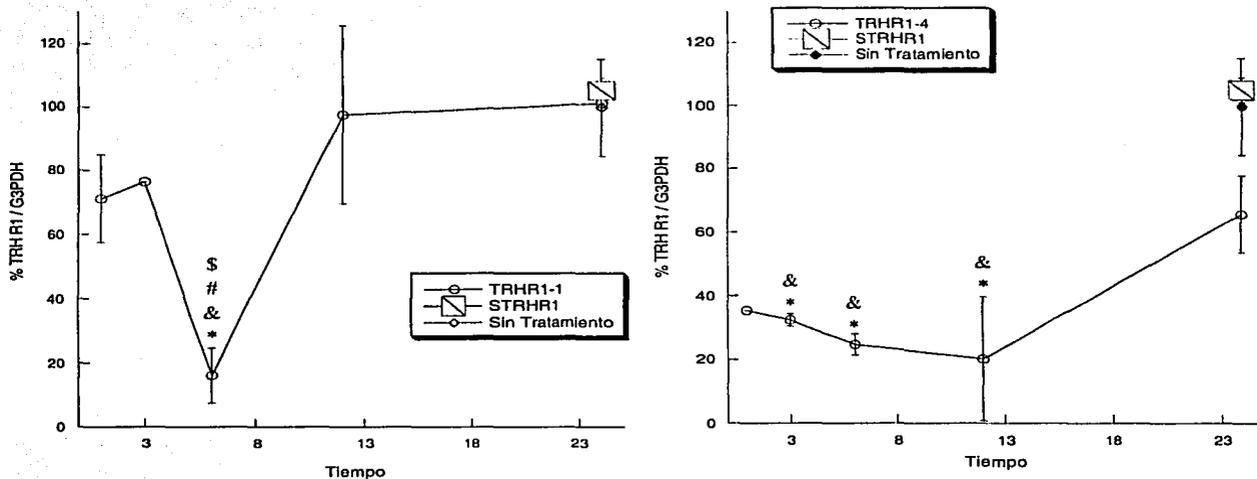


Figura 6. Cinética del efecto de los ODNs TRIIR1-1 y TRIIR1-4, usando una dosis de 2  $\mu$ M. Los tratamientos se hicieron al quinto día *in vitro* en células adenohipofisiarias. En A se muestra la cinética del efecto del TRIIR1-1. En B se muestra la del ODN TRIIR1-4. En ambos casos los tratamientos están expresados en porcentaje del cociente TRHR1 / G3PDH en relación al grupo sin tratamiento (100%). Cada punto en las líneas representa el promedio de tres platos por experimento y su respectivo error estándar (E.S.M.). Los puntos en los que no se muestra E.S.M. son el promedio de dos platos. El ANOVA para los tratamientos con 3 platos resultó estadísticamente significativo y mediante la prueba de Duncan se determinó cuáles tratamientos son los diferentes. \* =  $p < 0.05$  vs STRHR1, & =  $p < 0.05$  vs sin tratamiento, # =  $p < 0.05$  vs TRIIR1-1 3 hrs, \$ =  $p < 0.05$  vs TRIIR1-1 12 hrs.

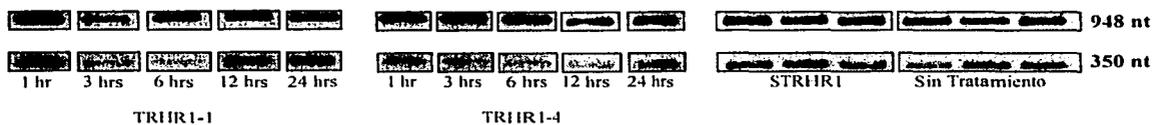


Figura 7. Electroforesis en gel de los productos de RT-PCR de las células tratadas con los ODNs TRIIR1-1 y TRIIR1-4 a 2  $\mu$ M. La figura muestra tratamientos representativos de la cinética de la figura 6. Los segmentos amplificados corresponden a los RNAs de la G3PDH (984 nt) y del TRIIR1 (350 nt). El ODN empleado y el tiempo de tratamiento están indicados debajo de cada carril. Los productos del RT-PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y escaneados mediante el Fluor-S Manager.

Con la idea de confirmar la cinética del efecto antisentido se decidió repetir el experimento anterior, con la salvedad de que el efecto se midió sólo desde las 3 horas y con una dosis mayor de ODN ( $5\mu\text{M}$ ). Aunque en algunos casos de la primer prueba esta concentración había mostrado un efecto más pobre que a 1 y  $2\mu\text{M}$ , esperábamos establecer claramente la cinética del efecto de estos ODNs. Los resultados de este experimento se resumen en las figuras 8, 9 y 10.

En la figura 8B se muestra que, en general, el ODN TRHR1-4 produjo el mismo patrón en la cinética del efecto antisentido sobre el RNAm del R1, aunque las disminuciones de las 3 hasta las doce horas fueron, aparentemente, más intensas. Así, a las 3 horas los niveles de RNA mensajero del R1 son de sólo el  $15.9\pm 15.9\%$  en relación al control sin tratamiento ( $100\pm 5.1\%$ ), a las 6 horas se alcanzó una disminución total (100%) y a las 12 horas se mostró un ligero incremento del mensajero ( $14.2\pm 7.5\%$ ).

El valor de p para el ANOVA de los tratamientos con el TRHR1-4 resultó menor a 0.05 y la prueba de Duncan muestra que las diferencias estadísticamente significativas ocurren entre los grupos de 3, 6 y 12 horas contra el control absoluto (sin tratamiento, figura 8B). De la misma forma que en el experimento a  $2\mu\text{M}$  no hubo diferencia entre los grupos de 3 a 12 horas, por lo que la disminución es estadísticamente homogénea. El tratamiento a 24 horas mostró un efecto distinto a lo que ocurre con  $2\mu\text{M}$  pues a pesar de que en ambos ocurrió una recuperación en los niveles de RNAm del R1, para el caso del tratamiento a  $5\mu\text{M}$  se presentaron niveles de mensajero 213% más altos que el control absoluto (Figura 8B).

Son notables las diferencias en la dinámica del efecto del TRHR1-1 entre los tratamientos a 2 y  $5\mu\text{M}$ , pues en el último caso mostró (Figura 8A), en concordancia con el experimento 1, la mayor disminución de los niveles del RNAm del R1 (para esta cinética particular) a las 12 horas (Figura 8A), lo que pone en duda los resultados, para este ODN, en el segundo experimento (Figuras 6A). Esta reducción en los niveles de RNAm del R1 fue de  $42\pm 27\%$ , lo cual está lejos de lo que se logra con el TRHR1-4 en cualquiera de las dos concentraciones ensayadas (Figuras 6B y 8B). Los resultados del experimento con TRHR1-1 mostraron una variación grande en todos los puntos medidos, por lo que el ANOVA no resultó significativo (Figura 8A). De forma similar a lo que ocurrió con el tratamiento de TRHR1-4, en el del ODN TRHR1-1 a las 24 horas se presentó un fuerte incremento en los niveles de RNAm del R1 (322%) con respecto al grupo sin tratamiento.

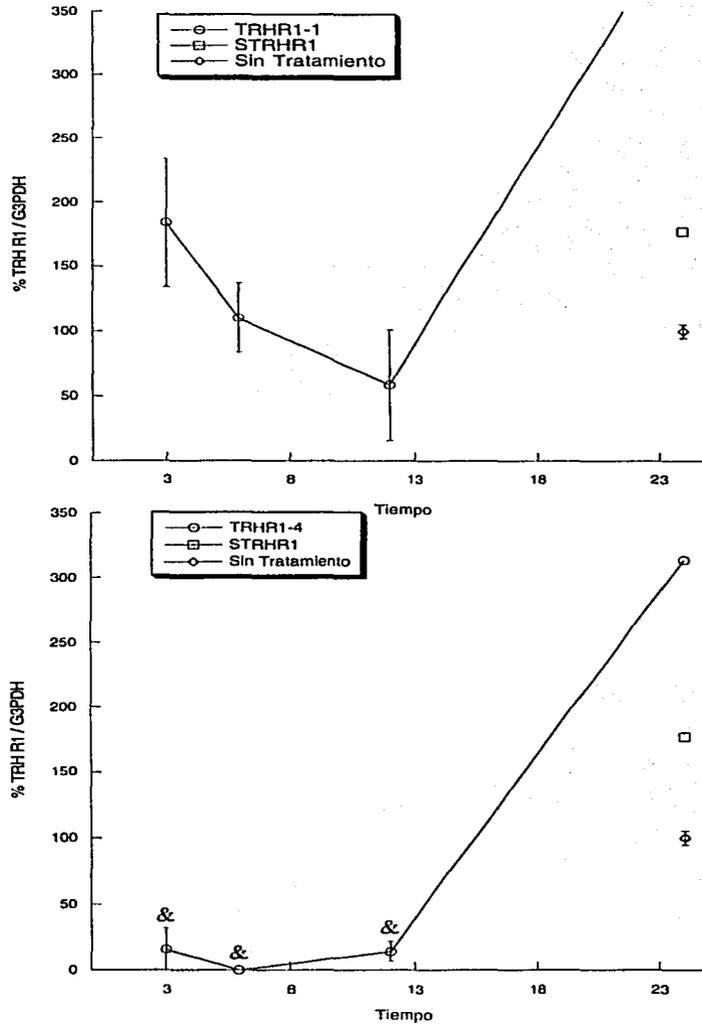
**B**

Figura 8. Cinética del efecto de los ODNs TRHR1-1 y TRHR1-4 usando una dosis de 5  $\mu$ M. Los tratamientos se hicieron al quinto día *in vitro* en células adenohipofisarias. En A se muestra la cinética del efecto del TRHR1-1. En B se presenta el efecto en el tiempo del TRHR1-4. En ambos casos se presenta el % del cociente TRH R1 / G3PDH en relación al control sin tratamiento. Cada punto en las líneas representa el promedio de tres platos por experimento y su respectivo error estándar (E.S.M.). Los puntos que no tienen E.S.M. son el promedio de dos platos. El ANOVA para los tratamientos con TRHR1-4 resultó estadísticamente significativo y mediante la prueba de Duncan se determinó cuáles tratamientos son los diferentes. & =  $p < 0.05$  vs sin tratamiento.

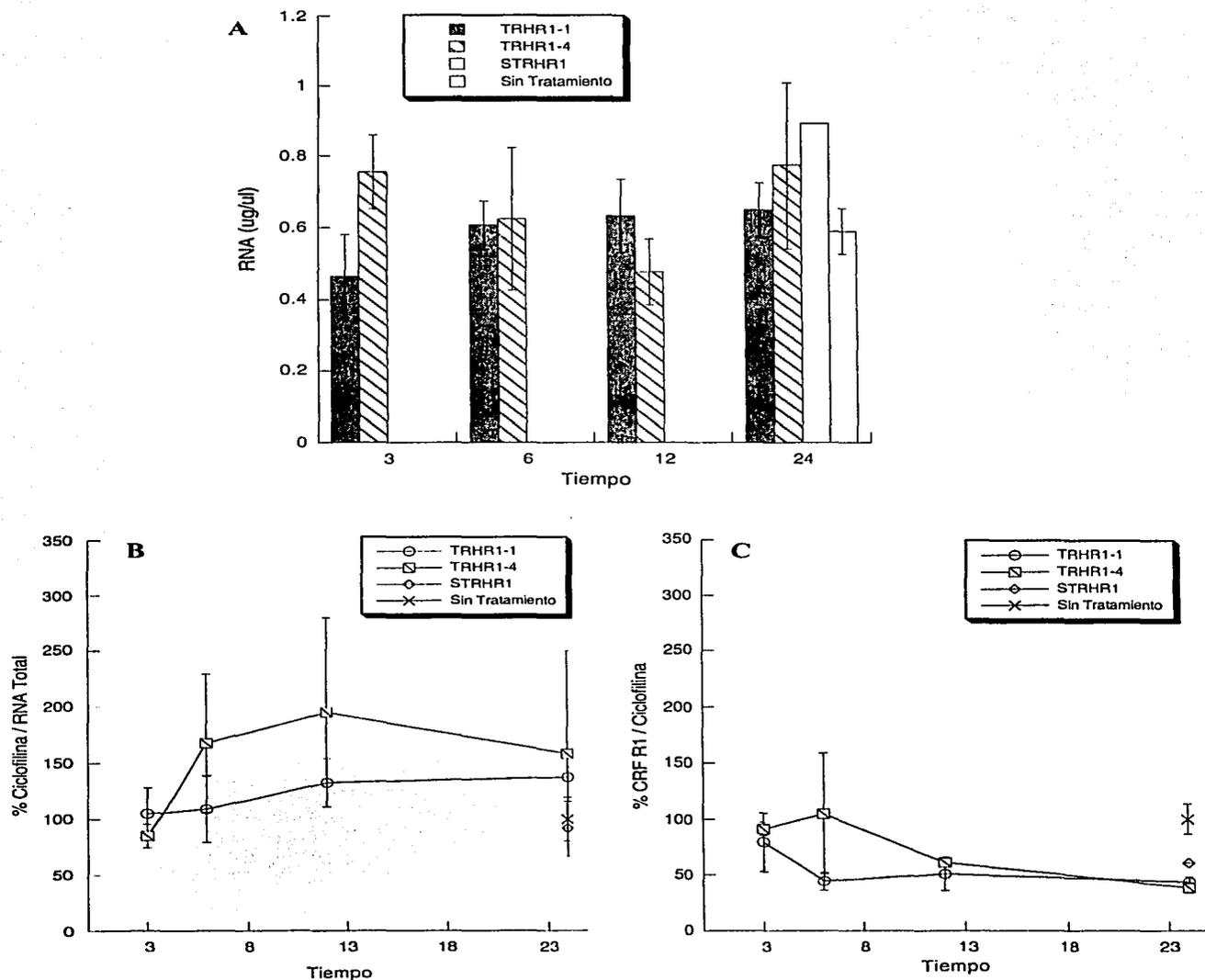


Figura 9. Especificidad del efecto de los ODNs TRHR1-1 y TRHR1-4 aplicados a  $5\mu\text{M}$ . En A se muestran las cantidades promedio de RNA total para cada tratamiento. En B se muestran los niveles de RNAm de ciclofilina (gen constitutivo) relativos al RNA total y en C la cantidad de RNAm del receptor 1 del CRF relativo al RNAm de la ciclofilina. Cada punto representa el promedio de tres platos por experimento y su respectivo error estandar (E.S.M.). Los puntos que no tienen E.S.M. son el promedio de dos platos. En todos los casos el ANOVA resulto no significativo.

Para confirmar la especificidad de estos resultados los RNA mensajeros de la ciclofilina y del receptor hipofisiario del CRF (CRF R1) fueron medidos por RT – PCR, adicionalmente se muestran las cantidades promedio de RNA total para cada tratamiento (Figura 9). Se usaron los controles anteriormente mencionados para descartar que las reducciones observadas se debieran a efectos inespecíficos en el estado general de la célula. La cantidad de RNA de los platos con diferentes tratamientos fue similar entre todos los grupos, y el análisis de varianza no fue significativo, lo cual implica que, en comparación a grupo del control absoluto, los tratamientos con los ODNs fosforotacionados no produjeron niveles de toxicidad suficientes para provocar muerte celular masiva, lo cual se hubiera reflejado en la cantidad de RNA total que se pudiese extraer después de los tratamientos (Figura 9A).

En la gráfica 9B se muestran los niveles del RNAm de la ciclofilina, el cual es un gen de expresión constitutiva, en este caso normalizados con respecto a los valores de RNA total (de la figura 9A). A lo largo de la cinética para ambos ODNs los valores promedio de RNAm de ciclofilina se mostraron en y por encima del nivel del control sin tratamiento, sin que estas diferencias (entre los grupos y con respecto al control sin tratamiento) resulten estadísticamente significativas después de que se analizaron por medio de un ANOVA. Las tendencias al incremento fueron mayores para los grupos de TRHR1-4 a las 6 y 12 horas de tratamiento (68 y 95.8% de incremento) si bien en estos casos se los errores estandar son de  $\pm 61$  y  $\pm 84\%$  respectivamente (Figura 9B).

Se midieron los niveles relativos de otro RNAm, el CRF R1, los cuales fueron normalizados con la ciclofilina y se presentan en la figura 9C. Tanto para los tratamientos con TRHR1-1, en los que no se produce efecto antisentido estadísticamente significativo sobre el TRH R1, como en los de TRHR1-4, los niveles de CRF R1 son semejantes entre si (sin diferencia estadística estimada a través de ANOVA) y con los tratamientos control (STRHR1 y sin tratamiento). Como en los experimentos descritos anteriormente, los datos están expresados como porcentajes del grupo sin tratamiento, en este caso son notables algunas tendencias a la disminución en los tratamientos con TRHR1-1 a las 6, 12 y 24 horas, y con TRHR1-4 a las 12 y 24 horas (Figura 9C). Es difícil explicar cómo estas modificaciones puedan estar relacionadas con los tratamientos antisentido, aunque no resultaron significativas.

La figura 10 muestra los productos de PCR de tratamientos representativos del experimento mostrados en la gráfica de la figura 8. De forma semejante a los dos experimentos anteriores, la G3PDH se mantiene más o menos pareja a lo largo de la cinética con los dos ODNs, mostrando, junto con los otros RNA mensajeros medidos, que el efecto sobre el TRH R1 parece ser específico.

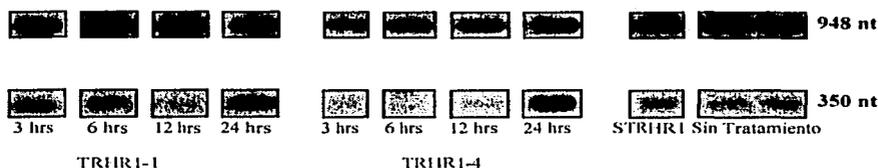


Figura 10. *Electroforesis en gel de los productos de RT-PCR de las células tratadas con los ODNs TRHR1-1 y TRHR1-4 a 5 $\mu$ M.* La figura muestra tratamientos representativos de la cinética de la figura 8. Los segmentos amplificados corresponden a los RNAm de la G3PDH (984 nt) y del TRH R1 (350 nt). El ODN empleado y el tiempo de tratamiento están indicados debajo de cada carril. Los productos del RT-PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y escaneados mediante el Fluor-S Manager.

Para confirmar los resultados del primer experimento (Figura 4), acerca de los efectos de los ODNs TRHR1-2 y TRHR1-3, además de asegurar que no estuviesen afectando los niveles del mensajero del R1 a un tiempo diferente al medido en esta prueba inicial, la cinética del efecto fue medida desde las 3 hasta las 24 horas postransfección para estos dos ODNs a una concentración de 5 $\mu$ M (Figura 11).

Ninguno de los tratamientos mostró reducción alguna en los niveles del RNAm del TRH R1, de hecho, hay varios momentos donde ocurre una tendencia al aumento en la cantidad de este RNA mensajero. Así, los grupos a 3 horas para ambos ODNs y el de TRHR1-3 a las 12 horas están incrementados alrededor del 100 y 199%, respectivamente, del control de transfección (Figura 11). El ANOVA de este experimento mostró que ninguno de los tratamientos tiene diferencias estadísticamente significativas entre si, de lo que resulta que los ODNs TRHR1-2 y TRHR1-3 carecen del efecto antisentido deseado.

Después de las pruebas anterior, dos parecían ser los ODNs más efectivos, el TRHR1-1 y el TRHR1-4, por lo que se decidió probar su efecto cuando son aplicados en combinación al sistema de células adenohipofisarias en cultivo que se había empleado para el resto de los tratamientos descritos. Ambos ODNs se transfectaron a una concentración de 5 $\mu$ M en el mismo plato (ya que a esa concentración parecían tener el mejor efecto, sobre todo el TRHR1-4), y las cantidades de RNAm del R1 fueron medidas a 3, 6, 12 y 24 horas postransfección, tal como se había hecho para los mismos ODNs en experimentos anteriores.

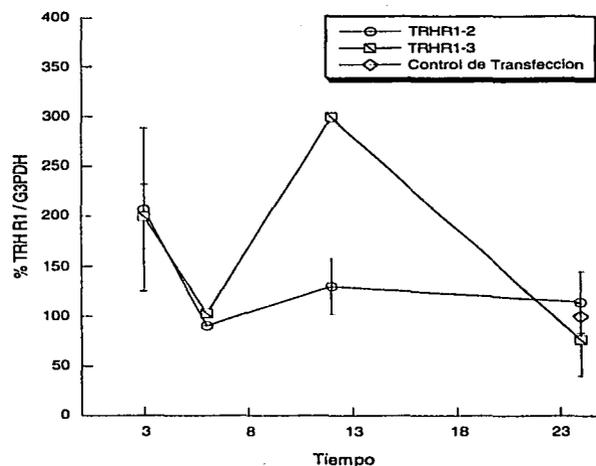
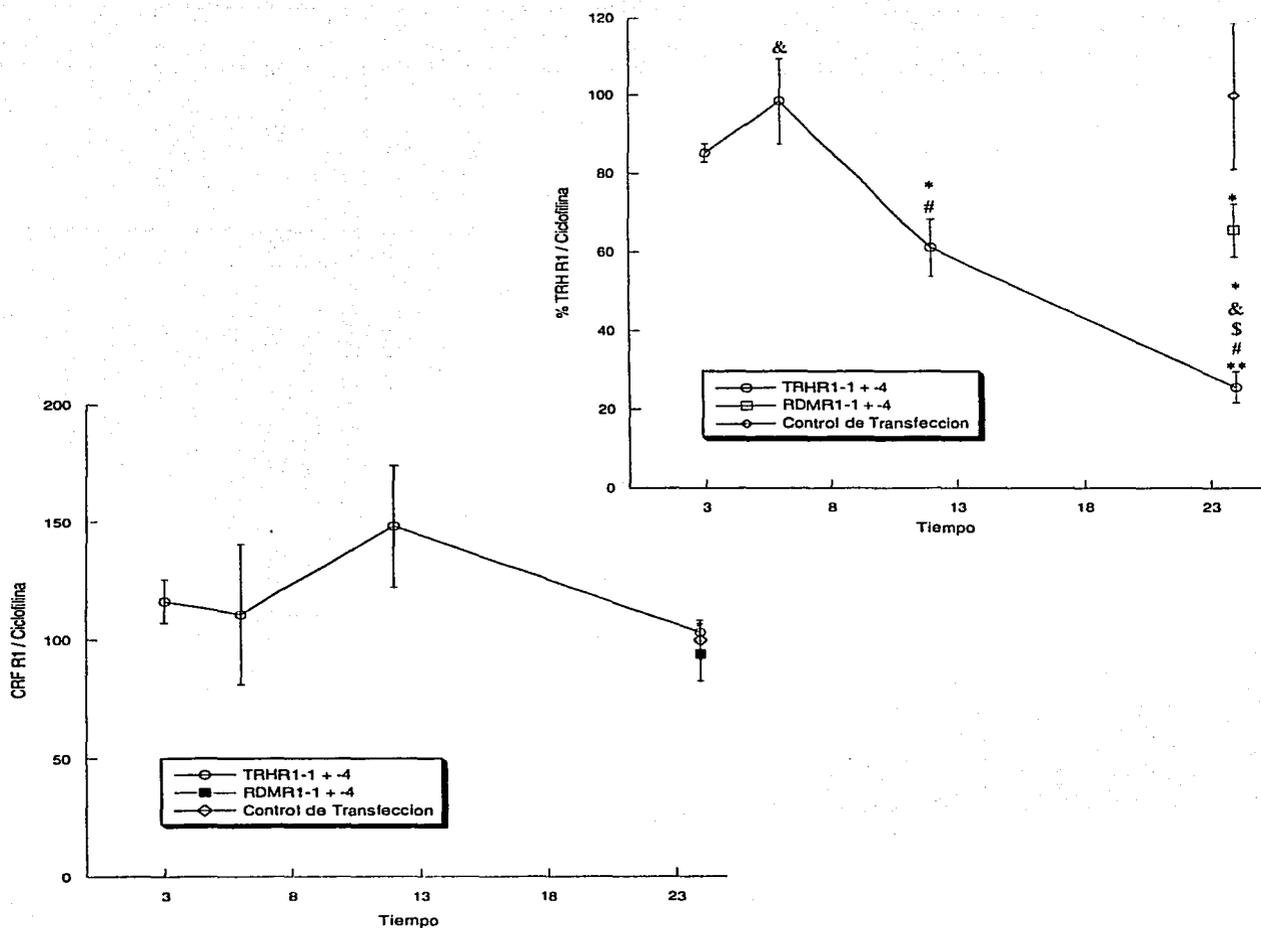


Figura 11. Cinética del efecto de los ODNs TRHR1-2 y TRHR1-3 sobre los niveles del RNAm del TRHR1. Ambos ODNs fueron aplicados a una concentración de 5 $\mu$ M, y su efecto fue medido a las 3, 6, 12 y 24 horas postransfección. Cada punto en la línea representa el promedio de tres platos de un experimento y su error estándar (E.S.M.). Los puntos sin E.S.M. son el promedio de solo dos platos. No hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control por t de Student.

La figura 12A muestra los resultados de este tratamiento. Los datos están presentados como porcentajes del control de transfección. También se presenta el efecto del tratamiento con una combinación de ODNs cuya secuencia es igual en composición de bases a la de los antisentido, pero en orden aleatorio. La cinética del efecto es diferente a cualquiera de las anteriormente descritas para los ODNs aplicados independientemente. A las 3 y 6 horas no hay ningún efecto de los ODNs en comparación al control de transfección (85.3 $\pm$ 2.3 y 98.4 $\pm$ 10.% respectivamente), a las 12 horas ocurre una disminución de 39%, la cual se acentúa a las 24 horas, donde los niveles de R1 son tan bajos como 25.7 $\pm$ 3.9%, los dos últimos casos son estadísticamente diferentes al control de transfección y del grupo de 6 horas (adicionalmente el grupo de 24 horas resultó estadísticamente diferente de los tratamientos a 3 horas y del RDMR1-1 + -4).

La disminución a 24 horas resulta muy semejante a algunas de las más grandes alcanzadas por los ODNs aplicados independientemente a la concentración de 2  $\mu$ M (Figura 6), si bien las del ODN TRHR1-4 a una dosis de 5 $\mu$ M son mayores (Figura 8), aunque en todos estos casos mencionados el efecto se manifiesta desde las 3 hasta las 12 horas.



**Figura 12. Cinética del efecto de los ODNs antisentido de TRHR1-1 más el TRHR1-4 sobre los niveles del RNAm del TRH R1.** Los ODNs fueron aplicados a una concentración de 5µM cada uno, las células fueron transfectadas por 4 horas y cosechadas a 3, 6, 12 y 24 horas. A) Niveles del RNAm del TRH R1 normalizados con el RNAm de la ciclofilina y comparados con el valor del control de transfección. Del análisis de varianza del experimento se obtuvo una  $p < 0.05$  y la prueba de Duncan reveló que el tratamiento a 24 horas era estadísticamente diferente del resto de los grupos, además existen diferencias entre los siguientes grupos: 12 horas vs control de transfección, 12 horas vs 6 horas, 6 horas vs RDMR1-1 + -4, RDMR1-1 + -4 vs control de transfección. B) Niveles del RNAm del CRF R1 en los mismos tratamientos, normalizados con la ciclofilina y comparados con el mismo control que en A. El ANOVA reveló que este grupo de datos no es estadísticamente diferente. En ambas figuras cada punto en la línea representa el promedio de 4 platos de un experimento,  $\pm$  el error estándar (E.S.M.). \* =  $p < 0.05$  vs control de transfección, & =  $p < 0.05$  vs RDMR1-1 + -4, \$ =  $p < 0.05$  vs 12 horas, # =  $p < 0.05$  vs 6 horas, \*\* =  $p < 0.05$  vs 3 horas.

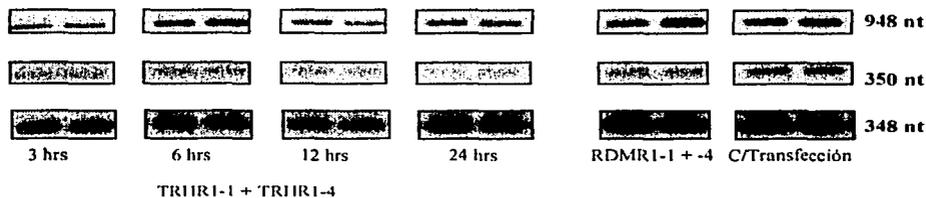


Figura 13. *Electroforesis en gel de los productos de RT-PCR de las células tratadas con los ODNs TRIIRI-1 + TRIIRI-4.* La figura muestra tratamientos representativos de la cinética de la figura 12. Los segmentos amplificados corresponden a los RNAm de la G3PDH (984 nt), del TRH R1 (350 nt) y de la ciclofilina (348nt). El ODN empleado y el tiempo de tratamiento están indicados debajo de cada carril. Los productos del RT-PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 3%, teñidos con bromuro de etidio y escaneados mediante el Fluor-S Manager.

Del tratamiento combinado resalta el efecto producido por los ODNs de secuencia aleatorizada, pues el RNAm del R1 aparece disminuido significativamente con respecto al control de transfección (y por ende con respecto al tratamiento a 6 horas) en un 35%, de forma similar a lo que sugerian los experimentos iniciales con los ODNs sentido a altas concentraciones. Cabe señalar que este efecto no se manifiesta en los tratamientos a 5µM con estos ODNs aplicados por separado.

En la figura 12B se muestran los niveles de RNAm para el CRF R1 para los mismos tratamientos. En este caso todos los grupos presentan cantidades semejantes de RNAm del CRF R1, y el ANOVA mostró que no existían diferencias significativas. Ésto permite aseverar que el efecto de la figura 9A es resultado específico de la acción combinada de los ODNs antisentido sobre el RNAm del TRH R1.

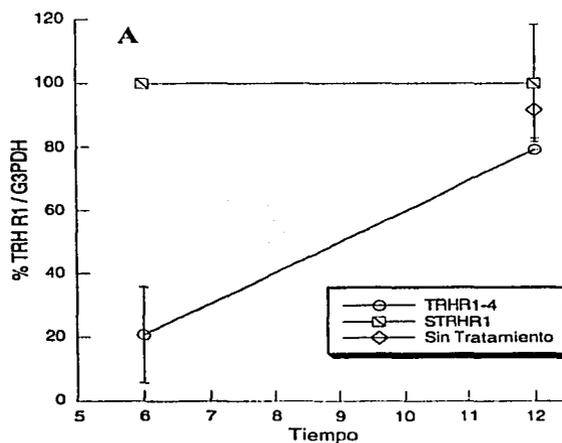
La figura 13 muestra una electroforesis de los productos de RT-PCR amplificados a partir de los RNA mensajeros del R1, la G3PDH y la ciclofilina. Los datos de R1 y ciclofilina fueron empleados para la construcción de la gráfica 12A. En este experimento se puede apreciar que los cambios observados en el R1 parecen ser producto del efecto antisentido, y que éste está siendo específico, al menos en comparación a los otros dos RNA mensajeros considerados y a los resultados de la gráfica 12B.

Como último punto en el establecimiento de las herramientas más apropiadas para la inhibición específica de la expresión del TRH R1 se decidió analizar la potencia del ODN TRHR1 – 4 (que parecía ser el más efectivo en la reducción del RNAm del TRH R1) para inducir su efecto cuando no poseía la tioprotección (con esqueleto fosfodiéster), en ausencia de transfectante en células adenohipofisarias con

sólo 24 horas en cultivo y sin suero bovino fetal; esto último pues se ha observado que *in vitro* las células toman del medio sustancias con más efectividad cuando carecen de suero. El ODN TRHR1-4 fue aplicado a una concentración de 5 $\mu$ M cada 3 horas, dos o cuatro veces, cosechándose a las 6 ó 12 horas respectivamente. Los resultados se muestran en la figura 14. A las 6 horas y con dos aplicaciones del ODN (10 $\mu$ M de concentración final), el RNA mensajero del R1 aparece disminuido 80% en comparación al control de 6 horas del STRHR1 aplicado de la misma forma; en cambio, a las 12 horas de tratamiento (y por tanto, con cuatro dosis de ODN, es decir una concentración final de 20 $\mu$ M) no parece haber un efecto sobre los niveles del RNAm del R1, lo cual resulta contradictorio con lo esperado (no hay análisis estadístico pues algunos grupos solo son el promedio de dos platos) (Figura 14A).

En la figura 14B se muestra la electroforésis del RT-PCR de G3PDH y TRH R1 de tratamientos representativos de cada grupo experimental. En todos los casos se observó que los niveles de G3PDH se mantienen constantes y que son los niveles de TRH R1 los que varían.

Las figuras 14C a la 14E son presentas fotografías de los cultivos con tratamientos a 6 horas con los ODNs STRHR1 (Figura 14E) y TRIHR1-4 (Figura 14E), además de células control sin tratamiento (Figura 14E). La apariencia de las células es similar entre los dos tratamientos con ODNs y el grupo intacto, por lo que la aplicación de los ODNs y la disminución ocurrida en el ARNm del TRH R1 no afectan la morfología de las células sugiriendo la ausencia de efectos secundarios detectables a simple vista.



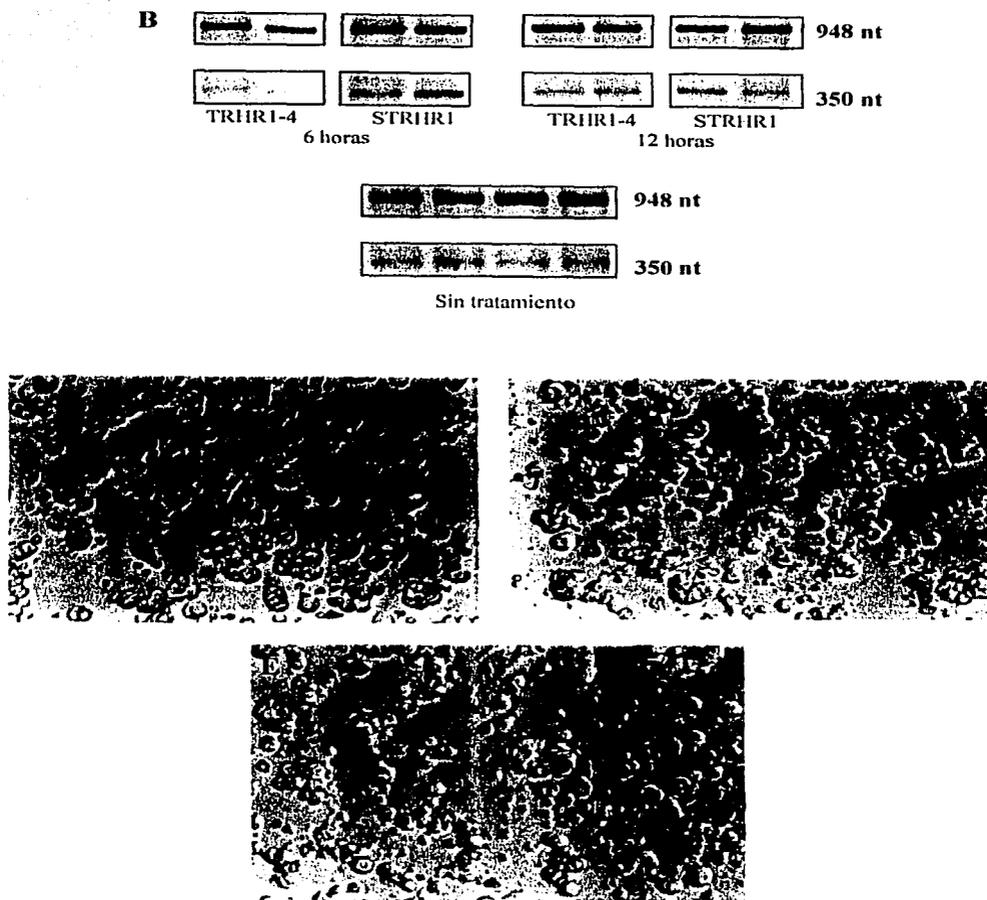


Figura 14. Efecto del ODN TRIIRI-4 en células adenohipofisiarias sin suero. El ODN se aplicó a las 24hrs de cultivo, a una concentración de 5  $\mu$ M cada 3hrs, por 2 ó 4 veces (cosechándose a las 6 ó 12hrs respectivamente). El control corresponde a la aplicación del ODN sentido STRIRI de la misma forma. A) Niveles del RNAm del R1. Cada punto de la línea representa el promedio de tres platos por tratamiento  $\pm$  error estandar (E.S.M.). Los puntos sin E.S.M. son el promedio de sólo dos platos. B) Electroforesis en gel de los productos de RT-PCR de las células tratadas en A; se muestran bandas representativas de cada tratamiento. Los segmentos amplificados corresponden a los RNAm de la G3PDH (984 nt) y del TRIIRI (350 nt); la dosis empleada y el ODN están indicados debajo de cada carril. C) Morfología de las células adenohipofisiarias sin tratamiento. D) Células tratadas con dos aplicaciones del ODN fosfodiéster STRIRI a una concentración de 5 $\mu$ M. D) Células tratadas con dos aplicaciones de 5 $\mu$ M del ODN fosfodiéster TRIIRI-4. Las fotografías fueron tomadas en un microscopio Nikon invertido en contraste de fases con un objetivo 40X.

## DISCUSIÓN

El sistema de transmisión TRHérgico se encuentra distribuido heterogéneamente en el SNC donde juega un papel como neurotransmisor o neuromodulador (Sharif y Burt, 1985; Horita, 1998; Bauer, *et al*, 1999). Los tratamientos farmacológicos con la hormona y sus análogos han producido una amplia gama de efectos conductuales que se han correlacionado a estructuras específicas del cerebro (Horita, 1998; Heuer, *et al*, 2000).

Son pocos los trabajos que han empleado a los ODNs antisentido para la comprensión de la función de la TRH endógena y del papel relativo de sus dos receptores en el SNC (Martinez, *et al*, 1998; 2001; García, *et al*, 2001; Luo, *et al*, 2001).

El objetivo central del presente trabajo fue el diseño de ODNs antisentido para reducir la expresión de la hormona liberadora de tiotropina y de sus dos receptores conocidos (TRH R1 y TRH R2) en sitios específicos del sistema límbico del cerebro de la rata, además de la selección *in vitro* del más efectivo par el TRH R1.

Para llevar a cabo el diseño de los ODNs se empleó un enfoque semejante al publicado por Patzel, *et al* (1999); que consistió en la búsqueda, a lo largo de las predicciones de estructura secundaria de menor energía del RNAm, de secuencias que no estén involucradas en interacciones intramoleculares. La base de esta estrategia es la idea de que no todas las secuencias de un RNAm tienen la misma accesibilidad local *in vivo* a los ODNs, como consecuencia del plegamiento (secundario y terciario) y de la presencia de proteínas de unión a RNA (Walton, *et al*, 2002); se supone que el paso limitante en la estructuración de un heterodúplex es la formación de los primeros 2 ó 3 pares de bases entre el ODN antisentido y el RNAm (nucleación), a lo cual siguen rápidos apareamientos entre el resto de las bases nitrogenadas, generando el producto de doble cadena. Dado que los dúplex RNA – RNA son más estables que los DNA – RNA, es razonable pensar que los nucleótidos no apareados del RNA deben jugar un papel importante en el proceso de nucleación.

A través del algoritmo *mfold* se realiza el modelamiento de las estructuras secundarias, basándose en las reglas termodinámicas del vecino más cercano que permiten la predicción o determinación del patrón de apareamientos Watson – Crick y de otros apareamientos no canónicos que ocurren entre las bases del RNA (Zucker, 1989). En este trabajo se realizó la búsqueda de dos de los sitios accesibles con base en las predicciones estructurales generadas para segmentos de 400 nt de cada RNAm, e independientemente se empleó la región de inicio de la traducción.

Ya que los enfoques teóricos para el diseño de los ODNs antisentido dependen totalmente de las predicciones de estructura, es recomendable el empleo de sistemas experimentales de prueba, previo a la aplicación *in vivo* (Walton, *et al*, 2002). Muchos de estos sistemas emplean reacciones de hibridación de varias especies de ODNs con el RNAm y el monitoreo de la accesibilidad de las estructuras por mapeo con la RNasa H de *E. coli* (Scherr, *et al* 2000). También se puede ensayar el efecto antisentido en sistemas de cultivo celular, por lo que se decidió aplicar los ODNs para el receptor TRH R1, que está mejor caracterizado farmacológica y fisiológicamente que el R2, en células adenohipofisarias en cultivo, comparando su efecto sobre los niveles del RNAm con el de un ODN reportado por Martínez, *et al* (1997). Este último ODN (TRHR1 – 4) es un 18 – mero complementario al sitio de inicio de la traducción que tiene algunos efectos fisiológicos cuando se aplica intracisternalmente (Martínez, *et al*, 1997; 2001), aunque no se reportan datos sobre los niveles de RNAm ni los de proteína.

Los resultados aquí presentados muestran que el TRHR1 – 4 es el ODN más efectivo en la inducción del efecto antisentido, manteniendo los niveles de RNAm disminuidos desde 60 hasta 80% por 12 horas cuando es aplicado a una concentración de 2 y de 5 $\mu$ M; otro ODN, el TRHR1-1, también tuvo algunos efectos, si bien estos resultaron poco reproducibles entre los experimentos y algunos sólo se manifestaron como tendencias no significativas estadísticamente. El TRHR1-1 está dirigido contra el AUG de forma similar al TRHR1-4, aunque a diferencia de éste último, es un 20 – mero. Las secuencias de estos dos ODNs se superponen parcialmente, sin embargo, las diferencias entre en secuencia y tamaño parecen ser suficientes para producir distintas cinéticas e intensidades de efecto. El TRHR1 – 1 muestra poca reproducibilidad entre distintos experimentos, aunque en todos los casos el efecto parece ser específico y sin efectos secundarios claros, al igual que el TRHR1 – 4.

La potencia del efecto del TRHR1 – 4 fue también probada en un paradigma de células sin transfectante y con varias aplicaciones del ODN, con la idea de medir su efecto sin la posible toxicidad asociada al transfectante. En este experimento se reprodujo la disminución de 80% del RNAm del R1 a las 6 horas (cuando solo se realizan dos aplicaciones), pero no se observa efecto cuando el ODN antisentido se aplica al doble de dosis (12 hrs = 4 dosis). Una explicación posible para este fenómeno es la activación de algún mecanismo que incremente la transcripción del gen blanco, después de que se ha inducido la inhibición del 80% del RNAm a las 6 hrs, semejante a lo que Guzowski y McGaugh (1997) sugieren para el incremento que observan en los niveles de proteína CREB cuando aplican un ODN antisentido dirigido contra su RNAm. A diferencia de este experimento que se realiza *in vivo*, los niveles de proteína están incrementados 50%, mientras que aquí el RNAm está al nivel del control,

quizá debido a que en el último caso la aplicación es continua y está ocurriendo cierta competencia entre la inducción de la transcripción y la degradación del RNAm. Este fenómeno también se observa con claridad en los experimentos de este trabajo, en los que se realiza una sola aplicación del ODN a una concentración de  $5\mu\text{M}$  en los tratamientos a 24 horas, aunque sólo en el caso de los de TRHR1-4 el incremento está precedido de una potente disminución del RNA mensajero. Los tratamientos con  $2\mu\text{M}$  de los ODNs no muestran estos efectos, por lo que no es posible descartar que las altas dosis estén contribuyendo fuertemente al incremento manifestado. Estos datos deben considerarse cuando se decida el número de dosis de la molécula antisentido que se aplicarán *in vivo*.

Varios de los tratamientos empleados muestran una gran dispersión de los datos, mucha de la cual pudiera deberse a inexactitudes en la aplicación de los ODN y falta de experiencia en el empleo de los métodos.

Ninguno de los otros ODNs antisentido diseñados a través de la estrategia de Patzel, *et al* (1997) produce el efecto deseado (excepto el TRHR1-2 a altas dosis), por lo que debe considerarse el hecho de que el método no es infalible por tanto, no todas las zonas elegidas son efectivas en la hibridación con ODNs. De hecho en el mismo reporte (Patzel, *et al* 1997) solo la mitad de los ODNs seleccionados para el gen *ICAM - 1* parece ser efectivo en reducciones mayores al 50%, y sólo 29% tienen la mayor potencia; coincidentemente con el caso del TRH R1, los ODNs dirigidos contra el AUG son el que muestran inhibiciones de las más potentes (Patzel, *et al*, 1997; Scherr, *et al*, 2000). En consideración a lo anterior, quizá sea necesario ampliar el número de ODNs a ensayar en cultivo para los RNAm de la preproTRH y del TRH R2.

Se ha señalado el hecho de que no hay suficiente información para entender las interacciones ODN – RNAm; incluso Walton, *et al* (2002) sugieren que la inspección de las predicciones estructurales como una base para la selección de ODNs efectivos no revela ninguna relación general con su efectividad antisentido; propone que un enfoque más productivo sería usar esta información en un modelo termodinámico más completo, el cual tome cuenta las energías libres de los procesos de desplegamiento del RNAm durante la hibridación y de reconstitución de la estructura del RNAm blanco cuando ya está unido al ODN. La suma de las energías mínimas de cada uno de los pasos da una energía libre total para la unión del antisentido a una secuencia en particular del RNAm, lo cual puede ser un parámetro importante para la predicción de ODNs antisentido efectivos. De hecho, esta energía libre total para los ODNs así generados ha mostrado una fuerte correlación con la afinidad de unión medida *in vitro*, con la activación de la RNasa H y, por lo tanto, con la eficacia en la reducción de la proteína

blanco (Walton, *et al*, 2002). Sin embargo, se reconoce que las modelaciones así hechas poco tienen que ver con la situación estructural del RNA mensajero *in vivo* (Walton, *et al*, 2002).

Las limitantes discutidas en los párrafos anteriores ha hecho que una de las metas principales en el empleo de la tecnología de antisentidos sea el desarrollo de técnicas para identificar los sitios blancos locales accesibles (Landgraf, *et al*, 1997) y se espera que, cuando se incremente la confiabilidad de estas predicciones, será posible reducir la cantidad de ODNs que deban ser probados *in vitro*. Para lo anterior se requiere la generación de más datos acerca de la biofísica de la interacción entre un ODN de corto tamaño y los RNAm blanco (Walton, *et al*, 2002).

Otro aspecto que se debe considerar, sobre todo al momento en que se realice la aplicación del ODN TRHR1-4 en el cerebro del rata, es que no todos los tipos celulares contienen la misma cantidad relativa de las diferentes RNAs H conocidas en los mamíferos, por lo que el efecto de un mismo ODN variará dependiendo de las poblaciones específicas de células que se traten (Ten Asbroek, *et al*, 2002).

A pesar de las inconveniencias discutidas el empleo de ODNs antisentido permitirá entender la participación del sistema de transmisión TRHérgico en estructuras particulares del cerebro y en paradigmas conductuales específicos, de forma más conveniente que un enfoque “knock out”, por las razones que a continuación se exponen.

Las técnicas de DNA recombinante han revolucionado la habilidad de manipular los mecanismos biológicos *in vivo*, permitiendo al investigador la disrupción de un sólo gen para comprender su relevancia fisiológica. Estos enfoques han sido empleados en el análisis de los mecanismos moleculares involucrados en la función cerebral y en el comportamiento del ratón, sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a cuestionar su utilidad y la validez de las interpretaciones de estos resultados (Gerlai, 2001).

Se han señalado problemas asociados al fondo genético y a la activación de procesos compensatorios disparados por la mutación durante el desarrollo (Gerlai, 2001). Por un lado, los fenotipos de los ratones genéticamente modificados dependen del fondo genético, implicando que la variación genética natural tiene un papel importante en la manifestación las consecuencias funcionales de la disrupción de un gen. En este contexto, la diversidad mezclada de la mayoría de los “knock outs” genera resultados poco consistentes en, por ejemplo, pruebas conductuales relacionadas con memoria y aprendizaje (Muller y Keck, 2002).

Por otro lado, la disrupción de un gen frecuentemente conlleva a la compensación completa o parcial de su función debido a que otros genes que expresan proteínas funcionalmente equivalentes

permanecen inalterados, siendo esta redundancia de los sistemas biológicos una lección frustrante aprendida de un gran número de ratones “knock out” que se han generado (Gerlai, 2001). Estos cambios fenotípicos secundarios son muy complejos, lo que resulta poco ventajoso en el análisis funcional de genes asociados con el aprendizaje y la memoria, sobre todo si el gen de interés juega un papel en el desarrollo, además del adulto (Gerlai, 2000). De hecho, hoy se reconoce que un gran número de genes, a los que sólo se atribuía un papel en el desarrollo del sistema nervioso, también están involucrados en plasticidad neuronal y la formación de memoria; genes como los de neurotrofinas, moléculas de adhesión celular y proteínas cinasas que participan en aspectos de plasticidad sináptica como la potenciación a largo plazo en el hipocampo (Gerlai, 1998).

Los modelos “knock out” también tienen limitaciones en cuanto a la especificidad espacio - temporal del efecto de la manipulación genética (Gerlai, 2000; Muller y Keck, 2002), ya que la disrupción está presente desde el momento de la fecundación y en todos los tejidos del animal. La segunda generación de ratones transgénicos inducibles y de “knock outs” restringidos a tipos celulares específicos prometen resolver estos últimos problemas (Gerlai, 2000). La expresión inducible de genes transgénicos ha sido empleada exitosamente a través del empleo del sistema transactivador de tetraciclina, mientras que el “knock out” célula específico fue empleado usando el sistema de CRE recombinasa (Gerlai, 1998).

Sin embargo, en el campo de las neurociencias no se ha logrado un verdadero control temporal (precisión en el “encendido” y “apagado” del gen) y espacial (por la rareza de promotores restringidos a localizaciones específicas en el SNC); además, estas técnicas producen efectos secundarios asociados con la administración de tetraciclina, su desarrollo resulta extremadamente laborioso y los resultados nunca están garantizados (Muller y Keck, 2002).

Por lo tanto, una de las alternativas más exitosas para estudiar la función de sistemas de neurotransmisión en el cerebro de animales vivos ha sido el empleo de los ODNs antisentido los cuales, en comparación a los modelos “knock out”, ofrecen control espacial del efecto, dado que su aplicación requiere cirugía estereotáxica del cerebro, pueden ser administrados de manera local sin que haya que preocuparse por los efectos colaterales que la expresión alterada de genes produzca en otros órganos además del cerebro. El punto anterior es relevante en el estudio de la función de la TRH en el sistema nervioso central, pues el ratón “knock out” para la hormona manifiesta, sobre todo, alteraciones en el eje hipotálamo – hipófisis – tiroideas (Yamada, *et al*, 1997; Shibusawa, *et al*, 2000). En estos ratones no se han realizado pruebas conductuales específicas para determinar si existen efectos en el sistema

nervioso central (Shibusawa, *et al*, 2000) sin embargo, se ha reportado la existencia de mutaciones inactivadoras del TRH R1 en humanos, cuya única consecuencia clínica es hipotiroidismo central, sin que la capacidad intelectual del individuo, entre otras características evaluadas, parezca estar afectada (Collu, *et al*, 1997). También debe considerarse la posibilidad de que existan varios péptidos semejantes a la TRH (“TRH – like”) que producen algunos de los efectos conductuales de la hormona a nivel central, cuando son aplicados exógenamente. De hecho, se ha propuesto que estos “TRH-like” están actuando a través de receptores distintos a TRH R1 y a TRH R2 (Hinkle, *et al*, 2002). Estos y algunos otros factores podrían funcionar como relevo en las funciones normales del péptido, tal como se ha observado para el “knock out” del CRF (Muglia, *et al*, 2001)

Para los ODNs antisentido puede controlarse el tiempo de aplicación, permitiendo manipular la función neural del adulto sin inducir cambios en el desarrollo del SNC, evitando la aparición de los mecanismos de compensación producidos por el incremento en la transcripción de genes que codifican proteínas funcionalmente equivalentes (Gerlai, 2001) o la participación de otras estructuras que confundirían la participación de la TRH en la zona de estudio.

Finalmente, a diferencia de los “knock outs” los ODNs antisentido pueden ser aplicados a cualquier especie, y no solo a los ratones.

En conclusión, para el TRH R1, el ODN TRHR1-4 parece ser el más efectivo en la reducción específica del RNAm, por lo que resulta el más adecuado para la disminución de los niveles de receptor 1 en puntos específicos del sistema límbico de la rata, sin que su aplicación combinada con el TRHR1-1 resulte más efectiva.

## PERSPECTIVAS

Uno de los aspectos que es necesario reforzar para la obtención de un ODN antisentido efectivo contra los RNAm de la TRH y del R2 es el del diseño de estas moléculas, en específico el punto de la obtención de un mejor modelo de estructura secundaria de los RNA mensajeros; si bien, como ya se ha mencionado, este enfoque tiene fuertes limitaciones y la prueba en sistemas celulares *in vitro* no debe dejarse de lado.

Para tal propósito debería emplearse la totalidad de la secuencia disponible de los RNA mensajeros de cada gen al momento de realizar la modelación y no emplear como criterio de selección sitios expuestos en la cercanía del inicio de la transcripción, sino las secuencias que aparezcan más expuestas a lo largo de todo el RNA mensajero. Con estas consideraciones se esperaría, en teoría, lograr una mejor selección de sitios blanco para ODNs antisentido.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal S. y E.R. Kandimalla. (2000) Antisense therapeutics: is it as simple as complementary base recognition? *Mol Med Today* 6: 72-81.
2. Baigent S.M. y P.J. Lowry. (2000) mRNA expression profiles for corticotrophin-releasing factor (CRF), urocortin, CRF receptors and CRF-binding protein in peripheral rat tissues. *J Mol Endocrinol* 25: 43-52.
3. Ballard T.M., Hunter A.J. y G.W. Bennett. (1996) Effect of TRH analogue, RX 77368, on AMPA-induced septal-hippocampal lesioned rats in an operant delayed non-matching to position test. *Psychopharmacology* 127: 265-275.
4. Barbieri M. y A. Nistri. (1997) Effects of the neuropeptide thyrotropin releasing hormone on GABAergic synaptic transmission of CA1 neurons of the rat hippocampal slice during hypoxia. *Peptides* 18: 585-591.
5. Bauer K. (1988) Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie (Paris)* 70: 69-74.
6. Bauer K. (1994) Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone degrading ectoenzyme. *Eur J Biochem* 224: 387-396.
7. Bauer K. y P. Novak. (1979) Characterization of a thyroliberin degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin on the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem* 99: 239-246.
8. Bauer K., Carmeliet P., Schulz M., Baes M. y C. Denef. (1990) Regulation and cellular localization of the membrane bound thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipophysial cells. *Endocrinology* 127: 1224-1233.
9. Bauer K., Schomburg L., Heuer H. y M. K. H. Schäfer. (1999) Thyrotropin releasing hormone (TRH), the TRH-receptor and the TRH-degrading ectoenzyme; three elements of a peptidergic signalling system. *Results Probl Cell Differ* 26: 13-42.
10. Bennett G.W., Ballard T.M., Watson C.D. y K.C. Fone. (1997) Effect of neuropeptides on cognitive function. *Exp Gerontol* 32: 451-69.
11. Bourdais J., Romero F., Uriostegui B., Cisneros M., Joseph-Bravo P. y J.L. Charli. (2000) [3-Me-His(2)]-TRH combined with dopamine withdrawal rapidly and transiently increases pyroglutamyl aminopeptidase II activity in primary cultures of adenohipophysial cells. *Neuropeptides* 34: 83-88.

12. Braasch D.A. y D.R. Corey. (2002) Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 41: 4503-4510.
13. Broberger C., Nylander I., Geijer T., Terenius L., Hokfelt T. y J. Georgieva. (2000) Differential effects of intrastrially infused fully and endcap phosphorothioate antisense oligonucleotides on morphology, histochemistry and prodynorphin statement in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 75: 25-45.
14. Brysch, W. The design of appropriate control experiments to ensure specificity in antisense oligonucleotide function. En: Leslie R.A. Hunter, A.J. y H.A. Robertson (Editores). Antisense Technology in the Central Nervous System. 1999. Oxford University Press. Nva. York, EUA.
15. Cálza L., Giardino L., Ceccatelli S., Zanni M., Elde R. y T. Hökfelt. (1992) Distribution of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat brain: an *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 51: 891-909.
16. Cao J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lembo P., Ahmad S. y P. Walker. (1998) Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem* 273: 32281-7.
17. Carr F.E., Fein H.G., Fisher C.U., Wessendorf M.W. y R.C. Smallridge. (1992) A cryptic peptide (160-169) of thyrotropin – releasing hormone demonstrates biological activity in vivo and iv vitro. *Endocrinology* 131: 2653-2658.
18. Charli J. L., Cruz C., Vargas M. A. y P. Joseph-Bravo. (1988) The narrow specificity PPII degrading TRH in brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int* 13: 237-242.
19. Charli J. L., Méndez M., Vargas M. A., Cisneros M., Assai M., Joseph-Bravo P. y S. Wilk. (1989) Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from brain slices. *Neuropeptides* 14: 191-196.
20. Charli J.L., Vargas M.A., Cisneros M., de Gortari P., Baeza M.A., Jasso P., Bourdais J., Perez L., Uribe R.M. y P. Joseph-Bravo. (1998) TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology (Bp)* 6: 45-57.
21. Chomczynski P. y N. Sacchi. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.
22. Collu R., Tang J., Castagné J., Lagacé G., Masson N., Huot C., Deal C., Delvin E., Faccenda E., Eidne K.A. y G. Van Vliet. (1997) A novel mechanism for isolated central hypothyroidism:

- inactivating mutations in the thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Clin Endo Metab* 82: 1561-1565.
23. Crews F.T., Morrow L., Criswell H. y G. Breese. (1996) Effects of ethanol on ion channels. *Int Rev Neurobiol* 39: 283-367.
24. Cruz C., Charli J.L., Vargas M.A. y P. Joseph-Bravo. (1991) Neuronal localization of PPII in primary cultures of fetal mouse brain. *J Neurochem* 56: 1594-1601.
25. De Gortari P., Fernandez-Guardiola A., Martínez A., Cisneros M. y P. Joseph-Bravo (1995) Changes in TRH and its degrading enzyme pyroglutamyl peptidase II during the development of amygdaloid kindling. *Brain Research* 679: 144-150.
26. De Gortari P., González M.E., Cisneros M., y P. Joseph-Bravo. (2000a) Effect os fasting on the content of thyrotropin releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post Weaned and adult rats. *Nutritional Neuroscience* 3: 255-265.
27. De Gortari P., Joseph-Bravo P., Monroy-Ruiz J., Martínez A., Cisneros M. y A. Fernández-Guardiola. (1998) Brain TRH content varies through amygdaloid kindling development according to after discharge frequency and propagation. *Epilepsia* 39: 897-903.
28. De Gortari P., Méndez M., Rodríguez-Keller I., Pérpez-Martínez L. y P. Joseph Bravo (2000b) Acute ethanol administration induces changes in TRH and proenkephalin expression in hypothalamic and limbic regions of rat brain. *Neurochem Intern* 37: 483-496.
29. De la Peña P., Delgado L.M., del Camino D. y F. Barros. (1992) Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells. *Biochem J* 284: 891-899.
30. De Wied D. (1997) Neuropeptides in learning and memory processes. *Behavioural Brain Res* 83: 83-90.
31. Drago F., Coppi G., Antonuzzo P.A., Valerio C., Genazzani A.A., Grassi M., Raffaele R. y U. Sapagnini. (1996) Effects of RGH 2202 on cognitive and motor behavior of the rat. *Neurobiol Aging* 17: 67-71.
32. Dyess, E.M., Segerson T.P. y Z. Liposits (1988) triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 123: 2291-2297.

33. Faden A.I., Fox G.B., Fan L., Araldi G.L., Qiao L., Wang S. y A.P. Kozikowski. (1999) Novel TRH analog improves motor and cognitive recovery after traumatic brain injury in rodents. *Am J Physiol* 277: R1196-1204.
34. French T.A., Masserano J.M. y N. Weiner. (1993) Influence in thyrotropin-releasing hormone and catecholaminergic interactions on CNS ethanol sensitivity. *Alcohol Clin Exp Res* 17: 99-106.
35. Friedman T.C. y S. Wilk. (1986) Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J Neurochem* 46: 1231-1239.
36. Fujimoto J., Straub R.E. y M.C. Gershengorn. (1991) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and phorbol myristate acetate decrease TRH receptor messenger RNA in rat pituitary GH3 cells: evidence that protein kinase-C mediates the TRH effect. *Mol Endocrinol* 5:1527-1532.
37. Garat B., Miranda J., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1985) Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading specifically TRH in brain. *Neuropeptides* 6: 27-40.
38. Garcia S.I., Alvarez A.L., Porto P.I., Garfunkel V.M., Finkielman S. y C.J. Pirola. (2001) Antisense inhibition of thyrotropin-releasing hormone reduces arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 37: 365-70.
39. Gerlai R. (2000) Protein targeting: altering receptor kinase function in the brain. *TINS* 23: 236-239.
40. Gerlai R., Williams S.P., Cairns B., Van Bruggen N., Moran P., Shih A., Caras I., Sauer H., Philips H.S. y J.W. Winslow. (1998) Protein targeting in the analysis of learning and memory: a potential alternative to gene targeting. *Exp Brain Res* 123: 24-35.
41. Gershengorn M.C. (1993) Thyrotropin-releasing hormone receptor: cloning and regulation of its expression. *Recent Prog Horm Res* 48: 341-363.
42. Gershengorn M.C. y R. Osman. (1996) Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev* 76: 175-91.
43. Guillemin R. (1978) Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science* 202: 390-402.
44. Guzowski J.F. y J.L. McGaugh. (1997) Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94: 2693-2698.
45. Hanyaloglu A.C., Vrecl M., Kroeger K.M., Miles L.E., Qian H., Thomas W.G. y K.A. Eidne. (2001) Casein kinase II sites in the intracellular C-terminal domain of the thyrotropin-releasing hormone

- receptor and chimeric gonadotropin-releasing hormone receptors contribute to beta-arrestin-dependent internalization. *J Biol Chem* 276: 18066-18074.
46. Hellgren I., Drvota V., Pieper R., Enoksson S., Blomberg P., Islam K.B. y C. Sylven. (2000) Highly efficient cell-mediated gene transfer using non-viral vectors and FuGene6: in vitro and in vivo studies. *Cell Mol Life Sci* 57: 1326-1333.
47. Heuer H., Schafer M.K., O'Donnell D., Walker P. y K. Bauer. (2000) Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* 428: 319-36.
48. Hinkle P.M. y A.H. Tashjian Jr. (1975) Thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptors in the GH3 strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 14: 3845-3851.
49. Hinkle P.M., Pekary A.E., Senanayaki S. y A. Sattin. (2002) Role of TRH receptors as possible mediators of analeptic actions of THR-like peptides. *Brain Res* 935: 59-64.
50. Höckfelt T., Tsuruo Y., Ulfhake B., Cullheim C., Arvidsson U., Foster G.A., Schultzberg M., Schalling M., Arborelius L., Freedman J., Post C. y T. Visser. (1989) Distribution of TRH-like immunoreactivity with special reference to coexistence with other neuroactive compounds. *Ann NY Acad Sci* 553: 76-105.
51. Horita A. (1998) An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci* 62(17-18): 1443-8.
52. Itadani H., Nakamura T., Itoh J., Iwaasa H., Kanatani A., Borkowski J., Ihara M. y M. Ohta. (1998) Cloning and characterization of a new subtype of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 68-71.
53. Iwasaki T., Yamada M., Satoh T., Konaka S., Ren Y., Hashimoto K., Kohga H., Kato Y. y M. Mori. (1996) Genomic organization and promoter function of the human thyrotropin-releasing hormone receptor gene. *J Biol Chem* 271: 22183-22188.
54. Jackson I.M. y S. Reichlin. (1974) Thyrotropin-releasing hormone (TRH): distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95: 854-862.
55. Jaworska-Feil L., Turchan J., Przewlocka B., Budziszewska B., Leskiewicz M. y W. Lason. (1999) Effect of pilocarpine- and kainite-induced seizures on thyrotropin-releasing hormone biosynthesis and receptors in the rat brain. *J Neural Transm* 106: 395-407.
56. Joseph-Bravo P., Fresan M.E., Cisneros M., Vargas M. A. y J.L. Charli. (1994) PPII activity is not in the processes of bulbospinal TRHergic neurons. *Neurosc Lett* 178: 243-246.

57. Joseph-Bravo P., Uribe R.M., Vargas M.A., Pérez-Martínez L., Zoeller T. y J.L. Charli. (1998) Multifactorial regulation of TRH metabolism. *Cel and Mol Neurobiol* 18: 231-247.
58. Kasparov S., Pawelsik E.M. y W. Zieglgansberger. (1994) Thyrotropin releasing hormone enhances excitatory postsynaptic potentials in neocortical neurons of the rat in vitro. *Brain Res* 656: 229-235.
59. Kasparov S.A. y B.A.Chizh. (1992) The NMDA.receptor agonist dizocilpine (MK-801) suppresses the memory facilitatory action of TRH. *Neuropeptides* 23: 87-92.
60. Knoblach S.M. y M.J. Kubek. (1997) Changes in thyrotropin releasing hormone levels in hippocampal subregions induced by a model of human temporal lobe epilepsy: effect of partial and complete kindling. *Neuroscience* 76: 85-95.
61. Koenig M.L., Yourick D.L. y J.L. Meyerhoff. (1996) TRH attenuates glutamate-stimulated increases in calcium in primary neuronal cultures. *Brain Res* 730: 143-149.
62. Konaka S., Yamada M., Satoh T., Ozawa H., Watanabe E., Takata K. y M. Mori. (1997) Expression of thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor mRNA in somatotrophs in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 138: 827-830.
63. Kroeger K.M., Hanyaloglu A.C., Seeber R.M., Miles L.E. y K.A. Eidne. (2001) Constitutive and agonist-dependent homo-oligomerization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. Detection in living cells using bioluminescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 276: 12736-12743.
64. Kubek M.J., Knoblach S.M., Shariff N.A., Burt D.R., Buterbaugh G.G. y K. Fuson. (1993) TRH gene expression and receptors are differentially modified in limbic foci by seizures. *Ann Neurol* 33: 70-76.
65. Landgraf R., Naruo T., Vecsernyes M., y I. Neumann. (1997) Neuroendocrine and behavioral effects of antisense oligonucleotides. *Eur J Endocrinol* 137: 326-35.
66. Lebedeva I. Y C.A. Stein. (2001) Antisense Oligonucleotides: promise and reality. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 403-419.
67. Lechan R. M., y R. Toni. (1992) Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. En: Neuroendocrinology. Nemeroff C.B. Editor. CRC Press, Boca Raton, E.U.A. Pags. 279 - 330.
68. Lechan R.M., Qi Y., Jackson I.M. y V. Mahdavi. (1994) Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 135: 92-100.

69. Lechan R.M., Wu P., Jackson I.M.D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G. y R.H. Goodman. (1986) Thyrotropin releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231: 159-161.
70. Lechan R.M., Wu P. e I.M. Jackson. (1986b) Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 119: 1210-1216.
71. Lee S.L., Stewart K. y R.H. Goodman. (1988) Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* 263: 16604-9.
72. Legradi G. y R.M. Lechan. (1998) The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 139: 3262-3270.
73. Leslie, R.A., Hunter, A.J. y H.A. Robertson. Antisense oligonucleotide regulation of gene statement in the CNS: an overview. En: Leslie R.A. Hunter, A.J. y H.A. Robertson. (Editores) Antisense Technology in the Central Nervous System. Oxford University Press. 1999. Nva. York, EUA.
74. Lok C.N., Viazovkina E., Min K.L., Nagy E., Wilds C.J., Damha M.J. y M.A. Parniak. (2002) Potent gene-specific inhibitory properties of mixed-backbone antisense oligonucleotides comprised of 2'-deoxy-2'-fluoro-D-arabinose and 2'-deoxyribose nucleotides. *Biochemistry* 41: 3457-3467.
75. Luo L.G., Lee S.L., Lechan R.M. e I.M.D. Jackson (2001) Effect pf preproTRH antisense on Thyrotropin-releasing hormone synthesis and viability of cultured rat diencephalic neurons. *Endocrine* 15: 79-85.
76. Manaker S., Winokur A., Rostene W.H. y T.C. Rainbow. (1985) Autoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone receptors in the rat central nervous system. *J Neurosci* 5: 167-174.
77. Mantyh P.W. y S.P. Hunt. (1985) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors. Localization by light microscopic autoradiography in rat brain using [3H][3-Me-His2]TRH as the radioligand. *J Neurosci* 5: 551-561.
78. Martínez, V., Wang L., y Y. Taché. (2001) Central TRH receptor 1 antisense blocks cold – induced gastric emptying but not brain c – Fos induction. *Peptides* 22: 81-90.
79. Martínez, V., Wu, S.W. y Y. Taché. (1998) Intracisternal antisense oligodeoxynucleotides to the thyrotropin – Releasing Hormone Receptor blocked vagal – dependent stimulation of gastric emptying induced by acute cold in rats. *Endocrinology* 139: 3730-3735.
80. Matsumoto A., Kumagai T., Takeuchi T., Miyasaki S. y K. Watanabe. (1987) Clinical effects of thyrotropin-releasing hormone for severe epilepsy in childhood: a comparative study with ACTH therapy. *Epilepsia* 28: 49-55.

81. Metcalf G. y P.W. Dettmar. (1981) Is thyrotrophin-releasing hormone and endogeneous ergotropic substance in the brain? *Lancet* 1: 586-589.
82. Miyamoto M., Hirai K., Takahashi H., Kato K., Nishiyama M., Okada H. y A. Nagoaka. (1993) Effects of sustained release formulation of TRH on learning impairments caused by scopolamine and AF64A in rodents. *Eur J Pharmacol* 238: 181-189.
83. Morley J.E. (1981) Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr Rev* 2:396-436.
84. Morzorati S. y M.J. Kubek. (1993) The effect of TRH on ethanol-induced sedation in alcohol-preferring and non-preferring rats. *Neuropeptides* 25: 283-287.
85. Muglia L.J., Jacobson L., Weninger S.C., Karalis K.P., Jeong K.H. y J.A. Majzoub. (2001) The physiology of corticotropin-releasing hormone deficiency in mice. *Peptides* 22: 725-731.
86. Muller M.B. y M.E. Keck. (2002) Genetically engineered mice for studies of stress-related clinical conditions. *J Psych Res* 36: 53-76.
87. Muller Y.L., Reitstetter R. y A.J. Yool. (1998) Regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channel expression in rat cerebellum during postnatal development. *J Neurosci* 18:16-25.
88. Nemeroff C.B. y D.L. Evans. (1989) Thyrotropin-releasing hormone (TRH), the thyroid axis, and affective disorder. *Ann NY Acad Sci* 553: 304-310.
89. Nemeroff C.B., Prange A.J., Bisset G.J., Breese G.R. y M.A. Lipton. (1975) Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and its beta-alanine analogue: potentiation of the anticonvulsant potency of phenobarbital in mice. *Psychopharmacol Commun* 1: 305-307.
90. Neumann I. (1997) Antisense oligonucleotides in neuroendocrinology: enthusiasm and frustration. *Neurochem Int* 31: 363-78.
91. Nikodemova M., Benick J., Brtko J. y V. Strbak. (1998) Chronic ethanol drinking and food deprivation affect rat hypothalamic-pituitary-thyroid axis and TRH in septum. *Endocrine* 9: 213-218.
92. O'Leary R.M. y B. O'Connor. (1995) Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 65: 953-963.
93. O'Connor B. y G. O'Cuinn. (1984) Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem* 144: 271-278.
94. O'Dowd B.F., Lee D.K., Huang W., Nguyen T., Cheng R., Liu Y., Wang B., Gershengorn M.C. y S.R. George. (2000) TRH-R2 exhibits similar binding and acute signaling but distinct regulation and anatomic distribution compared with TRH-R1. *Mol Endocrinol* 14: 183-93.

95. Ogasarawara T., Anakagawa Y., Ukai Y., Tamura M. y K. Kimura. (1995) NS-3(CG3703), a TRH analog, ameliorates scopolamine-induced memory disruption in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 51: 929-934.
96. Ogasawara T., Itoh Y., Tamura M., Ukai Y., Yoshikuni Y. y K. Kimura. (1996) NS-3, a TRH analog, reverses memory disruption by stimulating cholinergic and noradrenergic systems. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 391-399.
97. Oron Y., Straub R.E., Traktman P. y M.C. Gershengorn. (1987) Decreased TRH receptor mRNA activity precedes homologous downregulation: assay in oocytes. *Science* 238: 1406-8.
98. Panocka I., Coppi G., Maggioni A., Olgiati V., Sabbatini M. y F. Amenta. (1997) Effect of TRH analog posatirelin (RGH2202) on microanatomical changes induced by lesions of the nucleus basalis magnocellularis in the rat. *Drugs Exp Clin Res* 23: 3-23.
99. Patzel V., Steidl U., Kronenwett R., Haas R. y G. Sczakiel. (1999) A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. *Nucleic Acids Res* 27: 4328-34.
100. Pazos A., Cortes R. y J.M. Palacios. (1985) Thyrotropin-releasing hormone receptor binding sites: autoradiographic distribution in the rat and guinea pig brain. *J Neurochem* 45: 1448-1463.
101. Peng Ho S., Livanov V., Zhang W., Li J. y T. Lesher. (1998) Modification of phosphorothioate oligonucleotides yields potent analogs with minimal toxicity for antisense experiments in the CNS. *Brain Res Mol Brain Res* 62: 1-11.
102. Peng Ho, S. y P.R. Hartig. (1999) Antisense knockdown in the CNS – optimizing the strategy. En: Leslie R.A. Hunter, A.J. y H.A. Robertson (Editores). Antisense Technology in the Central Nervous System. Oxford University Press, New York, EUA.
103. Pérez-Martínez L., Carreón-Rodríguez A., González-Alzati M.E., Morales C., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1998) Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 68: 345-354.
104. Pizzi M., Boroni F., Benarese M., Moraitis C., Memo M. y P. Spano. (1999) Neuroprotective effect of thyrotropine-releasing hormone against excitatory amino acid-induced cell death in hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 330: 133-137.
105. Prange A.J., Garbutt J.C. y E.C. Loosen. (1987) En: Psychopharmacology: The third generation of progress. Meltzer H.Y. Editor. Raven Press, New York, E.U.A. Pags. 629-636.
106. Reichlin S. (1989) TRH: historical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 533: 1-6.

107. Rekling J.C. (1992) Interaction between thyrotropin-releasing hormone (TRH) and NMDA-receptor-mediated responses in hypoglossal motoneurons. *Brain Res* 578: 289-296.
108. Renaud L.P., Blume H.W., Pittman Q.J., Lamour Y. y A.T. Tan. (1979) TRH selectively depresses glutamate excitation of cerebral cortical neurons. *Science* 205: 1275-1276.
109. Richter K., Kaswashima E., Egger R. y G. Kreil. (1984) Biosynthesis of thyrotropin releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO J* 3: 617-621.
110. Rupnow J.H., Hinkle P.M. y J.E. Dixon (1979) A macromolecule which gives rise to thyrotropin releasing hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 89: 721-728.
111. Sabbatini M., Coppi G., Maggioni A., Ogliati V., Panocha I. Y F. Amenta. (1998) Effect of lesions of the nucleus basalis magnocellularis and of treatment with posatirelin on cholinergic neurotransmission enzymes in the rat cerebral cortex. *Mech Ageing Dev* 104: 183-94.
112. Sattin A., Pekary A.E. y R.L. Lloyd. (1999) TRH in therapeutic vs. nontherapeutic seizures: affective and motor functions. *Pharmacol Biochem Behav* 62: 575-583.
113. Schally A.V., Redding T.W., Bowers C.Y. y J.F. Barrett. (1969) Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 244: 4077-4088.
114. Schmitmeier S., Thole H., Bader A. y K. Bauer. (2002) Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur J Biochem* 269: 1278-1286.
115. Scharrer E. y B. Scharrer. (1945) Neurosecretion. *Physiological Reviews* 25: 171-181.
116. Schauder B., Schomburg L., Köhrle J. y K. Bauer. (1994) Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91: 9334-9538.
117. Scherr M., Rossi J.J., Sczakiel G. y V. Patzel. (2000) RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acid Res* 28: 2455-2461.
118. Segerson T.P., Kauer J., Wolfe H.C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I.M.D. y R.M. Lechan. (1987) Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238: 78-80.
119. Sharif N.A. y D.R. Burt. (1985) Limbic, hypothalamic, cortical and spinal regions are enriched in receptors for thyrotropin-releasing hormone: evidence from [3H]ultrofilm autoradiography and correlation with central effects of the tripeptide in rat brain. *Neurosci Lett* 60: 337-342.

120. Shibusawa N., Yamada M., Hirato J., Monden T., Satoh T. y M. Mori. (2000) Requirement of thyrotropin-releasing hormone for the postnatal functions of pituitary thyrotrophs: ontogeny study of congenital tertiary hypothyroidism in mice. *Mol Endocrinol* 14: 137-146.
121. Shishido Y., Furushiro M., Tanabe S., Shibata S., Hashimoto S. y T. Yokokura. (1999) Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur J Pharmacology* 372: 135-142.
122. Stevenin B. y S.L. Lee. (1995) Hormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone (TRH) gene. *The Endocrinologist* 5: 286-296.
123. Stocca G. y A. Nistri. (1995) Enhancement of NMDA receptor mediated synaptic potentials of rat hippocampal neurons in vitro by TRH. *Neurosci Lett* 184: 9-12.
124. Stocca G. y A. Nistri. (1996) The neuropeptide TRH modulates GABAergic transmission on pyramidal neurons of rat hippocampal slice. *Peptides* 17: 1197-1202.
125. Stwertka S.A., Vincent G.P., Gamzu E.R., MacNeil D.A. y A.G. Verderese. (1992) TRH protection against memory retrieval deficits is independent of endocrine effects. *Pharmacol Biochem Behav* 41: 45-52.
126. Ten Asbroek A.L.M.A., van Groenigen M., Nooij G. y F. Baas. (2002) The involvement of human ribonucleases H1 and H2 in the variation of response of cells to antisense phosphorothioate oligonucleotides. *Eur J Biochem* 269: 583-592.
127. Thomson B.L. y J.B. Rosen. (2000) Effects of TRH on acoustic startle, conditioned fear and active avoidance in rats. *Neuropeptides* 34: 38-44.
128. Torres H., Charli J.L., Vargas M.A., Gonzalez Noriega A. y P. Joseph-Bravo. (1986) Subcellular distribution of the enzymes degrading TRH and metabolites in rat brain. *Neurochem Int* 9: 103-110.
129. Ujihara H., Renmigng X., Sasa M., Ishihara K., Fujita Y., Yoshimura M., Kishimoto T., Serikawa T., Yamada J. y S. Takaoria. (1991) Inhibition by TRH of epileptic seizures in spontaneously epileptic rats. *Eur J Pharmacol* 196: 15-19.
130. Uribe R.M., Joseph-Bravo P., Pasten J., Ponce G., Méndez M., Covarrubias L. y J.L. Charli. (1994) Some events of TRH metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 54: 493-498.
131. Uribe R.M., Pérez-Martínez L., Covarrubias M.L., Gómez O.B., Covarrubias L., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1995) Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neurosci Letters* 201: 41-44.

132. Uribe R.M., Redondo J.L., Charli J.L. y P. Joseph-Bravo. (1993) Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 58: 140-145.
133. Valentijn K., Vandebulcke F., Piek E., Beauvillain J.C. y H. Vaudry. (1998) Distribution, cellular localization, and ontogeny of preprothyrotropin – releasing hormone – (160-169) (Ps4) – binding sites in the rat pituitary. *Endocrinology* 139: 1306-1313.
134. Vargas M.A., Cisneros M., Herrera J., Joseph-Bravo P. y J.L. Charli. (1992) Regional distribution of pyroglutamyl peptidase II in rabbit brain, spinal cord and organs. *Peptides* 13: 255-260.
135. Vargas M.A., Bourdais J., Sanchez S., Uriostegui B., Moreno E., Joseph-Bravo P. y J.L. Charli. (1998) Multiple hypothalamic factors regulate pyroglutamyl peptidase II in cultures of adenohypophyseal cells: role of the cAMP pathway. *J Neuroendoc* 10: 199-206.
136. Vargas M.A., Cisneros M., Joseph-Bravo P. y J.L. Charli. (2002) Thyrotropin-releasing hormone-induced down-regulation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity involves L-type calcium channels and cam kinase activities in cultures of adenohypophyseal cells. *J Neuroendocrinol* 14: 184-193.
137. Vargas M.A., Joseph-Bravo P. y J.L. Charli (1994) Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohypophyseal cells. *Neuroendocrinology* 60: 323-330.
138. Vijayan E. y S.M. McCann. (1977) Suppression of feeding and drinking activity in rats following intraventricular injection of thyrotropin releasing hormone (TRH). *Endocrinology* 100: 1727-1730.
139. Wahlestedt C., Golanov E., Yamamoto S., Yee F., Ericson H., Yoo H., Inturrisi C.E. y D.J. Reis. (1993) Antisense oligodeoxynucleotides to NMDA-R1 receptor channel protect cortical neurons from excitotoxicity and reduce focal ischaemic infarctions. *Nature* 363: 260-3.
140. Walton S.P., Stepharopoulos G.N., Yarmush M.L. y C.M. Roth. (2002) Thermodynamic and kinetic characterization of antisense oligodeoxynucleotide binding to a structured mRNA. *Biophys J* 82: 366-377.
141. Wang W. y M.C. Gershengorn. (1999) Rat TRH receptor type 2 exhibits higher basal signaling activity than TRH receptor type 1. *Endocrinology* 140: 4916-9.

142. Wang Y.H. y R.A. Maurer. (1999) A role for the mitogen-activated protein kinase in mediating the ability of thyrotropin-releasing hormone to stimulate the prolactin promoter. *Mol Endocrinol* 13: 1094-1104.
143. Yamada M., Saga Y., Shibusawa N., Hirato J., Murakami M., Iwasaki T. Hashimoto K., Satoh T., Wakabayashi K., Taketo M.M. y M. Mori. (1997) Tertiary hypothyroidism and hyperglycemia in mice with targeted disruption of the thyrotropin-releasing hormone gene. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 94: 10862-10867.
144. Yamada M., Shibusawa N., Hashida T., Ozawa A., Monden T., Satoh T. y M. Mori. (2000) Expression of thyrotropin – releasing hormone (TRH) receptor subtype 1 in mouse pancreatic islets and HIT – T15, an insulin – secreting clonal \_ cell line. *Life sciences* 66: 1119-1125.
145. Yamamura M., Kinoshita K., Nakagawa H. y R. Ishida. (1991) Pharmacological study of TA-0910, a new TRH analog (IV): Effects on experimental memory impairment in mice and rats. *Jpn J Pharmacol* 55: 241-253.
146. Zhao D., Yang J., Jones K.E., Gerald C. Suzuki Y., Hogan P.G., Chin W.W. y A.H. Tashjian Jr. (1992) Molecular cloning of a complementary deoxyribonucleic acid encoding the thyrotropin-releasing hormone receptor and regulation of its messenger ribonucleic acid in rat GH cells. *Endocrinology* 130: 3529-3536.
147. Zhu C.C., Cook L.B. y P.M. Hinkle. (2002) Dimerization and phosphorylation of thyrotropin-releasing hormone receptors are modulated by agonist stimulation. *J Biol Chem* [publicación electrónica previa ala impresión].
148. Zoeller R.T.y P.K. Rudeen. (1992) Ethanol blocks the cold-induced increase in thyrotropin-releasing hormone mRNA in paraventricular nuclei but not the cold-induced increase in thyrotropin. *Brain Res Mol Brain Res* 13: 321-330.
149. Zucker M. (1989) On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 244: 48-52.

## ANEXO 1 : BLAST de la secuencia sentido de los ODNs antisentido

Resultados de la búsqueda con BLAST para los ODNs antisentido:

### ▪ TRH-1

>gi|7242210|ref|NM\_013046.1| Rattus norvegicus Thyrotropin releasing hormone (Trh), mRNA  
Length = 768

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 atgccgggaccttggttgct 20  
|||||

Sbjct: 1 atgccgggaccttggttgct 20

>gi|340989|gb|M23643.1|RATTRH02 Rattus norvegicus thyrotropin-releasing hormone (THR) gene, exon 2  
Length = 256

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 atgccgggaccttggttgct 20  
|||||

Sbjct: 26 atgccgggaccttggttgct 45

>gi|207469|gb|M36317.1|RATTRHA Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor mRNA, complete cds  
Length = 1322

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 atgccgggaccttggttgct 20  
|||||

Sbjct: 103 atgccgggaccttggttgct 122

>gi|207467|gb|M12138.1|RATTRH Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) mRNA, complete cds  
Length = 1321

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 atgccgggaccttggttgct 20  
|||||

Sbjct: 103 atgccgggaccttggttgct 122

>gi|341709|gb|M27464.1|RATTHR02 Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene, exon 2  
Length = 256

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 atgccgggaccttggttgct 20  
|||||  
Sbjct: 26 atgccgggaccttggttgct 45

▪ TRH-2

>gi|7242210|ref|NM\_013046.1| Rattus norvegicus Thyrotropin releasing hormone (Trh), mRNA  
Length = 768

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gatcttcaccctaactggta 20  
|||||

Sbjct: 36 gatcttcaccctaactggta 55

>gi|340989|gb|M23643.1|RATTRH02 Rattus norvegicus thyrotropin-releasing hormone (THR) gene, exon 2  
Length = 256

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gatcttcaccctaactggta 20  
|||||

Sbjct: 61 gatcttcaccctaactggta 80

>gi|207469|gb|M36317.1|RATTRHA Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor mRNA, complete cds  
Length = 1322

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gatcttcaccctaactggta 20  
|||||

Sbjct: 138 gatcttcaccctaactggta 157

>gi|207467|gb|M12138.1|RATTRH Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) mRNA, complete cds  
Length = 1321

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gatcttcaccctaactggta 20  
|||||

Sbjct: 138 gatcttcaccctaactggta 157

>gi|341709|gb|M27464.1|RATTHR02 Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene, exon 2

Length = 256

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gatcttcaccctaactggta 20

|||||

Sbjct: 61 gatcttcaccctaactggta 80

▪ TRH-3

>gi|7242210|ref|NM\_013046.1| Rattus norvegicus Thyrotropin releasing hormone (Trh), mRNA

Length = 768

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ccagaacgtcgattccttgtg 20

|||||

Sbjct: 145 ccagaacgtcgattccttgtg 164

>gi|340989|gb|M23643.1|RATTRH02 Rattus norvegicus thyrotropin-releasing hormone (THR) gene, exon 2

Length = 256

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ccagaacgtcgattccttgtg 20

|||||

Sbjct: 170 ccagaacgtcgattccttgtg 189

>gi|207469|gb|M36317.1|RATTRHA Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor mRNA, complete cds

Length = 1322

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 ccagaacgtcgattccttgtg 20

|||||

Sbjct: 247 ccagaacgtcgattccttgtg 266

>gi|207467|gb|M12138.1|RATTRH Rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) mRNA, complete cds

Length = 1321

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus  
 Query: 1 ccagaacgtcgcattccttgtg 20  
 |||  
 Sbjct: 247 ccagaacgtcgcattccttgtg 266  
 >gi|341709|gb|M27464.1|RATTHR02 Rat thyrotropin-releasing  
 hormone (TRH) gene, exon 2  
 Length = 256  
 Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
 Identities = 20/20 (100%)  
 Strand = Plus / Plus  
 Query: 1 ccagaacgtcgcattccttgtg 20  
 |||  
 Sbjct: 170 ccagaacgtcgcattccttgtg 189

• TRHR1-1

>gi|7110728|ref|NM 013047.1| Rattus norvegicus Thyrotropin  
 releasing hormone receptor (Trhr), mRNA  
 Length = 3279  
 Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
 Identities = 20/20 (100%)  
 Strand = Plus / Plus  
 Query: 1 gccactgaagatggagaatg 20  
 |||  
 Sbjct: 258 gccactgaagatggagaatg 277  
 >gi|505298|emb|X66726.1|RNPTHYRHR R.norvegicus mRNA for  
 pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor  
 Length = 3363  
 Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
 Identities = 20/20 (100%)  
 Strand = Plus / Plus  
 Query: 1 gccactgaagatggagaatg 20  
 |||  
 Sbjct: 331 gccactgaagatggagaatg 350  
 >gi|57394|emb|X64630.1|RNTRHRMR R.norvegicus mRNA for  
 thyrotropin releasing hormone receptor  
 Length = 3279  
 Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
 Identities = 20/20 (100%)  
 Strand = Plus / Plus  
 Query: 1 gccactgaagatggagaatg 20  
 |||  
 Sbjct: 258 gccactgaagatggagaatg 277  
 >gi|207471|gb|M90308.1|RATTRHR Rat thyrotropin-releasing  
 hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds

Length = 1515  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gccactgaagatggagaatg 20  
|  
Sbjct: 80 gccactgaagatggagaatg 99  
>gi|464199|dbj|D17469.1|RATTRHRA Rat mRNA for thyrotropin  
releasing hormone receptor, complete cds

Length = 3687  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gccactgaagatggagaatg 20  
|  
Sbjct: 295 gccactgaagatggagaatg 314

• TRHR1-2

>gi|7110728|ref|NM 013047.1| Rattus norvegicus Thyrotropin  
releasing hormone receptor (Trhr), mRNA  
Length = 3279

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20  
|  
Sbjct: 278 aaaccgtcagtgaactgaac 297

>gi|545494|gb|S69161.1|S69161 Rattus sp. thyrotropin-releasing  
hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds  
Length = 1187

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20  
|  
Sbjct: 11 aaaccgtcagtgaactgaac 30

>gi|545492|gb|S69160.1|S69160 Rattus sp. thyrotropin-releasing  
hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds  
Length = 1239

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20  
|

Sbjct: 11 aaaccgtcagtgaactgaac 30  
>gi|505298|emb|X66726.1|RNPTHYRHR R.norvegicus mRNA for  
pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor

Length = 3363

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20

|||||

Sbjct: 351 aaaccgtcagtgaactgaac 370

>gi|57394|emb|X64630.1|RNTRHRMR R.norvegicus mRNA for  
thyrotropin releasing hormone receptor

Length = 3279

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20

|||||

Sbjct: 278 aaaccgtcagtgaactgaac 297

>gi|207471|gb|M90308.1|RATTRHR Rat thyrotropin-releasing  
hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds

Length = 1515

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20

|||||

Sbjct: 100 aaaccgtcagtgaactgaac 119

>gi|464199|dbj|D17469.1|RATTRHRA Rat mRNA for thyrotropin  
releasing hormone receptor, complete cds

Length = 3687

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 aaaccgtcagtgaactgaac 20

|||||

Sbjct: 315 aaaccgtcagtgaactgaac 334

• TRHR1-3

>gi|7110728|ref|NM\_013047.1| Rattus norvegicus Thyrotropin  
releasing hormone receptor (Trhr), mRNA

Length = 3279

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gctcccgcgcgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 306 gctcccgcgcgcaagtagccg 325  
>gi|545494|gb|S69161.1|S69161 Rattus sp. thyrotropin-releasing  
hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds  
Length = 1187  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gctcccgcgcgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 39 gctcccgcgcgcaagtagccg 58  
>gi|545492|gb|S69160.1|S69160 Rattus sp. thyrotropin-releasing  
hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds  
Length = 1239  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gctcccgcgcgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 39 gctcccgcgcgcaagtagccg 58  
>gi|505298|emb|X66726.1|RNPTHYRHR R.norvegicus mRNA for  
pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor  
Length = 3363  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gctcccgcgcgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 379 gctcccgcgcgcaagtagccg 398  
>gi|57394|emb|X64630.1|RNTRHRMR R.norvegicus mRNA for  
thyrotropin releasing hormone receptor  
Length = 3279  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gctcccgcgcgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 306 gctcccgcgcgcaagtagccg 325  
>gi|207471|gb|M90308.1|RATTRHR Rat thyrotropin-releasing  
hormone receptor (TRH-R) mRNA, complete cds  
Length = 1515  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 gctcccgccgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 128 gctcccgccgcaagtagccg 147  
>gi|464199|dbj|D17469.1|RATTRHRA Rat mRNA for thyrotropin  
releasing hormone receptor, complete cds  
Length = 3687

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 gctcccgccgcaagtagccg 20  
|||||  
Sbjct: 343 gctcccgccgcaagtagccg 362

• TRHR2-1

>gi|4883996|gb|AF149717.1|AF149717 Rattus norvegicus  
thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) mRNA  
Length = 1089

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 caccagcaagatggatggcc 20  
|||||

Sbjct: 5 caccagcaagatggatggcc 24

>gi|3641600|gb|AF091715.1|AF091715 Rattus norvegicus  
thyrotropin releasing hormone receptor-2 (TRHR-2) mRNA, complete  
cds

Length = 1641  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 caccagcaagatggatggcc 20  
|||||

Sbjct: 352 caccagcaagatggatggcc 371

>gi|3660553|dbj|AB015645.1|AB015645 Rattus norvegicus mRNA for  
G protein-coupled receptor, complete cds  
Length = 2351

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus

Query: 1 caccagcaagatggatggcc 20  
|||||

Sbjct: 204 caccagcaagatggatggcc 223

• TRHR2-2

>gi|4883996|gb|AF149717.1|AF149717 Rattus norvegicus  
thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) mRNA,  
Length = 1089

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gtaatgtctcgctcattcac 20

|||||

Sbjct: 28 gtaatgtctcgctcattcac 47

>gi|3641600|gb|AF091715.1|AF091715 Rattus norvegicus  
thyrotropin releasing hormone receptor-2 (TRHR-2) mRNA, complete  
cds

Length = 1641

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gtaatgtctcgctcattcac 20

|||||

Sbjct: 375 gtaatgtctcgctcattcac 394

>gi|3660553|dbj|AB015645.1|AB015645 Rattus norvegicus mRNA for  
G protein-coupled receptor, complete cds

Length = 2351

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 gtaatgtctcgctcattcac 20

|||||

Sbjct: 227 gtaatgtctcgctcattcac 246

• TRHR2-3

>gi|4883996|gb|AF149717.1|AF149717 Rattus norvegicus  
thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) mRNA  
Length = 1089

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Plus

Query: 1 caagtggtctcagtccttcc 20

|||||

Sbjct: 77 caagtggtctcagtccttcc 96

>gi|3641600|gb|AF091715.1|AF091715 Rattus norvegicus mRNA,  
complete cds

Length = 1641

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005

Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 caagtggtctcagtcttcc 20  
          |||||  
Sbjct: 424 caagtggtctcagtcttcc 443  
>gi|3660553|dbj|AB015645.1|AB015645 Rattus norvegicus mRNA for  
G protein-coupled receptor, complete cds  
          Length = 2351  
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.005  
Identities = 20/20 (100%)  
Strand = Plus / Plus  
Query: 1 caagtggtctcagtcttcc 20  
          |||||  
Sbjct: 276 caagtggtctcagtcttcc 295

## ANEXO 2: Resultados de Oligo v.4.0 para los ODNs antisentido

Resultados del programa OLIGO v.4.0 para los ODNs antisentido.

### TRH-1

Lower Primer, 20-mer [1]:

Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.5 kcal/mol

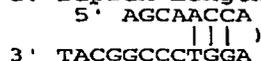


Lower Primer: the most stable dimer overall: 4 bp, -9.8 kcal/mol



Hairpin Stems in the Lower Primer [1] (20-mer)

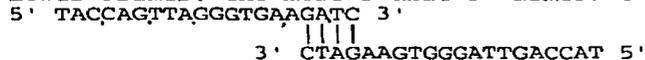
1. Duplex Length = 3 bp;  $\Delta G = 41.7$  kcal/mol; Loop = 2 nucleotides



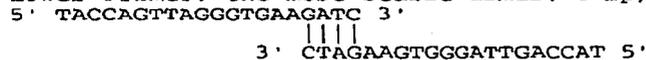
### TRH-2

Duplex Formation (position of the oligo = 36):

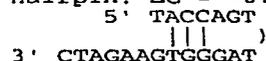
Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 4 bp, -4.7 kcal/mol



Lower Primer: the most stable dimer: 4 bp, -4.7 kcal/mol



Hairpin:  $\Delta G = -0.1$  kcal/mol, Loop = 6 nt,  $T_m = 25^\circ$

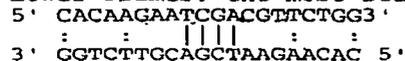


### TRH-3

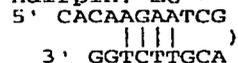
Duplex Formation (position of the oligo = 145):

Lower Primer: no 3'-terminal dimer formation

Lower Primer: the most stable dimer: 4 bp, -6.8 kcal/mol



Hairpin:  $\Delta G = -0.8$  kcal/mol, Loop = 6 nt,  $T_m = 38^\circ$



TRHR1-1

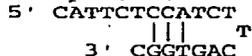
Duplex Formation (position of the oligo = 258):  
 Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, -3.1 kcal/mol  
 5' CATTCTCCATCTTCAGTGGC 3'



Lower Primer: the most stable dimer: 3 bp, -5.0 kcal/mol  
 5' CATTCTCCATCTTCAGTGGC 3'



Hairpin:  $\Delta G = -0.9$  kcal/mol, Loop = 7 nt,  $T_m = 49^\circ$

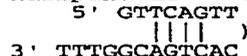


TRHR1-2

Duplex Formation (position of the oligo = 278):  
 Lower Primer: no 3'-terminal dimer formation  
 Lower Primer: the most stable dimer: 5 bp, -6.4 kcal/mol  
 5' GTTCAGTTCACTGACGGTTT3'

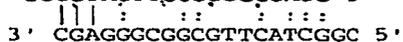


Hairpin:  $\Delta G = -0.6$  kcal/mol, Loop = 4 nt,  $T_m = 37^\circ$

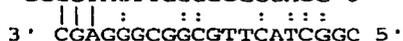


TRHR1-3

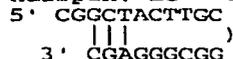
Duplex Formation (position of the oligo = 306):  
 Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 3 bp, -4.7 kcal/mol  
 5' CGGCTACTTGGCGGCGGGAGC 3'



Lower Primer: the most stable dimer: 3 bp, -4.7 kcal/mol  
 5' CGGCTACTTGGCGGCGGGAGC 3'



Hairpin:  $\Delta G = 0.2$  kcal/mol, Loop = 12 nt,  $T_m = 21^\circ$



TRHR2-1

Duplex Formation (position of the oligo = 352):

Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.9 kcal/mol

```

5' GGCCATCCATCTTGCTGGTG 3'
   || : : :
3' GTGGTCGTTCTACCTACCGG 5'
  
```

Lower Primer: the most stable dimer: 4 bp, -9.3 kcal/mol

```

5' GGCCATCCATCTTGCTGGTG3'
   ||||
3' GTGGTCGTTCTACCTACCGG 5'
  
```

Hairpin:  $\Delta G = -0.7$  kcal/mol, Loop = 10 nt,  $T_m = 41^\circ$

```

5' GGCCATCCAT
   |||
3' GTGGTCGTT
  
```

TRHR2-2

Duplex Formation (position of the oligo = 375):

Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.3 kcal/mol

```

5' GTGAATGAGCGAGACATTAC3'
   || : : :
3' CATTACAGAGCGAGTAAGTG 5'
  
```

Lower Primer: the most stable dimer: 4 bp, -5.3 kcal/mol

```

5' GTGAATGAGCGAGACATTAC 3'
   ||||
3' CATTACAGAGCGAGTAAGTG 5'
  
```

Hairpin:  $\Delta G = -1.2$  kcal/mol, Loop = 7 nt,  $T_m = 46^\circ$

```

5' GTGAATGAGC
   |||| G
3' CATTACAGA
  
```

TRHR2-3

Duplex Formation (position of the oligo = 424):

Lower Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.9 kcal/mol

```

5' GGAAGACTGAGACCACCTTG 3'
   || :
3' GTTCCACCAGAGTCAGAAGG 5'
  
```

Lower Primer: the most stable dimer: 3 bp, -3.5 kcal/mol

```

5' GGAAGACTGAGACCACCTTG 3'
   ||| : : :
3' GTTCCACCAGAGTCAGAAGG 5'
  
```

Hairpin:  $\Delta G = 1.0$  kcal/mol, Loop = 11 nt,  $T_m = 2^\circ$

```

5' GGAAGACTGA
   ||| G
3' GTTCCACCA
  
```

**ANEXO 3: Blast y resultados de Oligo v.4.0 para RDMR1-1 y RDMR1-4**  
 ODNs con la secuencia aleatorizada para TRHR1-1 y TRHR1-4

▪ RDMR1-1:

Correspondiente a TRHR1-1.

Secuencia: 5' GCA CCC TACTGT TCG TAT TC 3'

Resultados del BLAST: no hay secuencias similares para *Rattus norvegicus*.

Resultado de OLIGO v.4.0:

Duplex Formation (position of the oligo = 1):  
 Upper Primer: no 3'-terminal dimer formation  
 Upper Primer: the most stable dimer: 2 bp, -3.6 kcal/mol  
 5' GCACCCTACTGTTTCGTATTC 3'  
                                   : || :  
 3' CTTATGCTTGTTCATCCCACG 5'

Hairpin:  $\Delta G = 2.1$  kcal/mol, Loop = 5 nt  
 5' GCACCCTACTG  
                   ||| T  
 3' CTTATGCT

Hairpin Stems in the Upper Primer [1] (20-mer)  
 1. Duplex Length = 3 bp;  $\Delta G = 2.1$  kcal/mol; Loop = 5 nucleotides  
 5' GCACCCTACTG  
                   ||| T  
 3' CTTATGCT

▪ RDMR1-4:

Correspondiente a TRHR1-4.

Secuencia: 5' CAT GGT TTT TAC GAC CTC 3'

Resultados del BLAST: no hay secuencias similares para *Rattus norvegicus*.

Resultado de OLIGO v.4.0:

Duplex Formation (position of the oligo = 1):  
 Upper Primer: the most stable 3'-dimer: 2 bp, -1.6 kcal/mol  
 5' CATGGTTTTTACGACCTC 3'  
                           || :  
 3' CTCCAGCATTTTTGGTAC 5'

Upper Primer: the most stable dimer: 4 bp, -5.3 kcal/mol  
 5' CATGCTTTTTTACGACCTC3'  
                           ||||  
 3' CTCCAGCATTTTTGGTAC 5'

Hairpin:  $\Delta G = -0.3$  kcal/mol, Loop = 7 nt,  $T_m = 31^\circ$   
 5' CATGGTTTT  
           ||| T  
 3' CTCCAGCA

Hairpin Stems in the Upper Primer [1] (18-mer)  
 1. Duplex Length = 3 bp;  $\Delta G = -0.3$  kcal/mol; Loop = 7 nucleotides  
 5' CATGGTTTT  
           ||| T  
 3' CTCCAGCA