

00551

2005



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

"DIFERENCIACION TERMINAL DEL FENOTIPO TRHERGICO: PAPEL DEL BDNF EN EL HIPOTALAMO Y CARACTERIZACION DE RATONES TRANSGENICOS TRH-GFP"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

P R E S E N T A

JUAN CARLOS PEREZ MONTER

TUTOR: Dr. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA

ABRIL DEL 2005

PÉREZ MONTER, JUAN CARLOS

m343242

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo financiero recibido por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología durante el tiempo que tomó la realización de este trabajo.

Especialmente a la Dra. Leonor Pérez-Martínez porque gran parte de este trabajo es producto de su labor; agradezco además, sus consejos y su paciencia durante la discusión de los datos.

Al Dr. Jean Louis Charli por creer nuevamente en mí para llevar a cabo este trabajo en su laboratorio.

Al mismo tiempo agradezco el apoyo incondicional por parte de todos los miembros del laboratorio para poder realizar algunos de los experimentos.

A los miembros del Bioterio encabezado por Elizabeth Mata; Sergio González; Graciela Cabeza; Bárbara Mondragón y sus colaboradores en la unidad

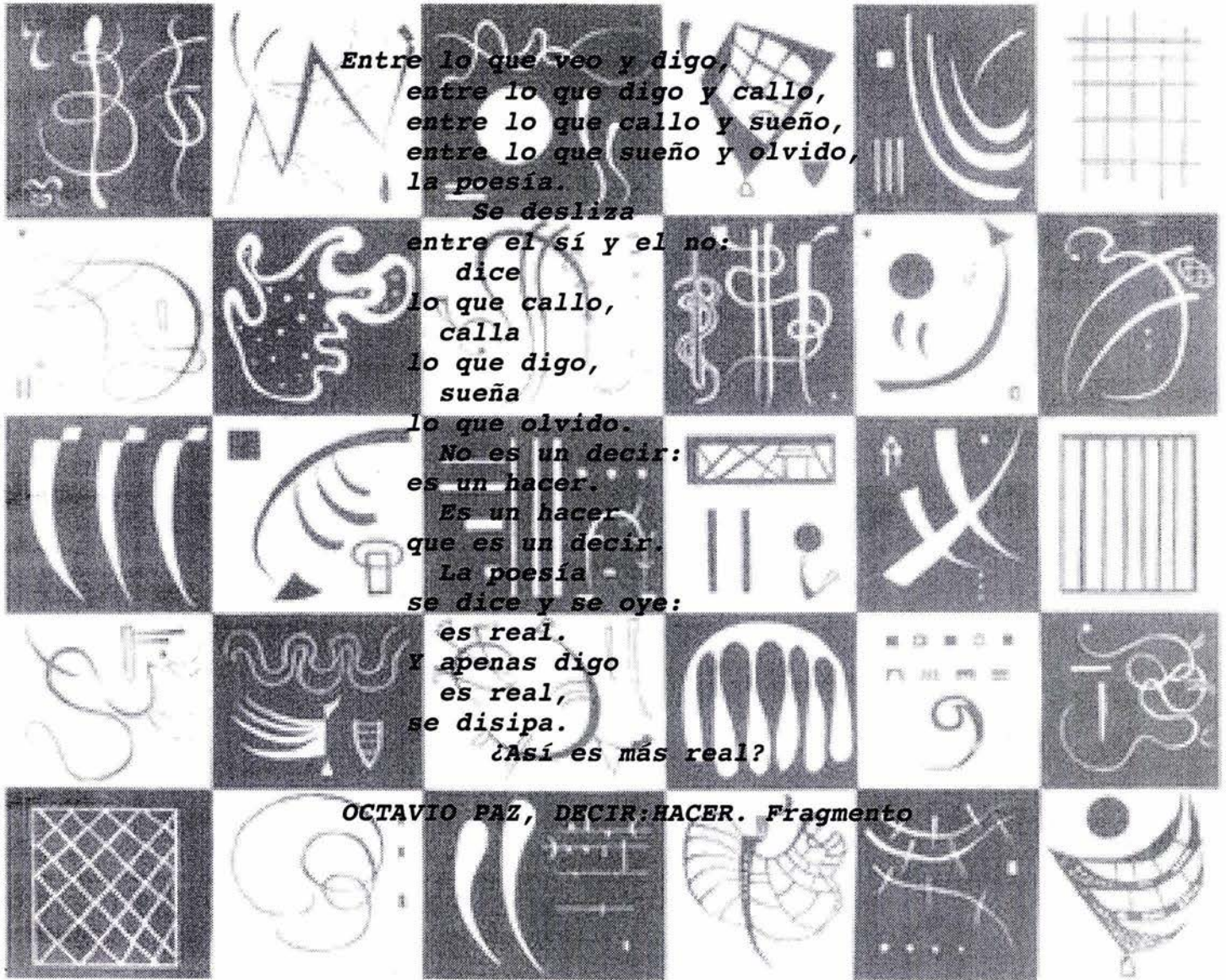
A los miembros de la unidad de síntesis encabezados por Paul Gaytan, Eugenio López, Jorge Yáñez y Santiago Becerra, por su colaboración en la generación de los oligonucleótidos usados para los ensayos de hibridación.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Juan Carlos Peter Alatorre

FECHA: 11/ Abril 2005

FIRMA: 



A

Paula

Martha

Pepe

INDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN	2
INTRODUCCION	4
I El sistema neuroendócrino	4
II Desarrollo del fenotipo peptidérgico en el hipotálamo	6
III Factores transcripcionales y el fenotipo peptidérgico hipotalámico	6
IV Regulación del fenotipo peptidérgico hipotalámico por neurotrofinas	7
V Regulación hormonal del fenotipo peptidérgico hipotalámico	9
VI El fenotipo TRHérgico	9
VII Estructura del gene de TRH y análisis de la región regulatoria	11
JUSTIFICACION	
Desarrollo del fenotipo TRHérgico hipotalámico	14
OBJETIVOS	17
CAPITULO I	
Impacto del BDNF sobre el fenotipo TRHérgico hipotalámico	18
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
MATERIALES Y METODOS	
Cultivo primario	20
RT-PCR	22
Análisis estadístico	24
RESULTADOS	
Cinética y reversibilidad del efecto de BDNF sobre los niveles del mRNA de TRH en cultivos hipotalámicos neonatales	25
Efecto del BDNF sobre las neuronas hipofisiotrópicas del NPV	28
CAPITULO II	
Caracterización de la expresión de GFP en el SNC de ratones transgénicos TRH-GFP	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
MATERIALES Y METODOS	
Animales	32

IV

Generación de líneas de ratones transgénicos TRH-GFP	32
1. Construcción del fragmento de DNA para microinyección	32
2. Microinyección	34
3. Determinación del genotipo por slot-blot	34
a) extracción de DNA genómico	34
b) Hibridación	35
4. Extracción de RNA total	36
5. RT-PCR	37
6. Western Blot	38
7. Diseño de oligonucleótidos e hibridación in situ	39
8. Fijación de cerebros para análisis microscópico	41
9. Inmunohistoquímica	41
10. Microscopía	42
RESULTADOS	
Análisis del genotipo de los ratones transgénicos	44
Análisis de la expresión del mRNA de GFP por RT-PCR	46
Estimación de la de GFP en ratones TRH-GFP por Western blot	46
Generación de un mapa de expresión de TRH en el SNC de ratón	48
Análisis microscópico de la distribución de la GFP en el cerebro de los ratones positivos para la inserción	49
DISCUSION	
El BDNF y su papel en el desarrollo del fenotipo TRHérgico	54
Efecto de la región que va de -776 a +84 pb en la regulación De la expresión de GFP en el SNC de los ratones transgénicos TRH-GFP	59
CONCLUSIONES	63
PERSPECTIVAS	64
REFERENCIAS	65
APENDICE	70

RESUMEN

Las neuronas que conforman al hipotálamo murino nacen durante el período que comprende los días embrionarios 12 (E12) a E16. Genes involucrados en la regulación de este proceso han sido descritos. Algunos de ellos codifican factores de transcripción, otros codifican receptores, y otros más codifican factores tróficos. Entre estos últimos destacan aquellos que pertenecen a la familia del NGF, como BDNF, NT-3 y NT-4. Del conjunto de células neurales que constituyen al hipotálamo, se encuentran aquellas que regulan la actividad secretora de la adenohipófisis o hipofisiotrópicas. La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) sintetizada en el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, regula la síntesis y liberación de tirotrópina (TSH) y prolactina en adenohipófisis. Se ha reportado que las neuronas hipotalámicas fetales responden al estímulo con BDNF *in vitro* incrementando los niveles basales del mRNA de TRH. Sin embargo, datos sobre la respuesta de la población TRHérgica hipofisiotrópica del NPV al BDNF no se conocen. En este trabajo se reporta el efecto del BDNF sobre el fenotipo TRHérgico en cultivos primarios hipotalámicos o del núcleo paraventricular neonatal. En el cultivo hipotalámico, la cinética de la respuesta al estímulo fue evaluada. El estímulo con BDNF (50 ng/ml) mantenido por 4 días incrementa la expresión del mRNA de TRH de forma similar a lo observado durante la etapa fetal. El estímulo con BDNF mantenido por 12 días consecutivos, muestra un incremento similar al cuarto día, pero disminuye al décimo día. En las células del núcleo paraventricular estimuladas con BDNF durante 4 días, el incremento en el mRNA de TRH fue mayor con respecto a la observada en el hipotálamo completo. Estos resultados muestran que las neuronas neonatales del hipotálamo son responsivas al estímulo con BDNF, pero dicha respuesta es reversible cuando se retira el estímulo después del cuarto día; y de desensibilización cuando se mantiene a lo largo del cultivo.

Por otro lado, datos previos muestran que la región (-776/+84 pb) del gene de TRH es capaz de restringir la expresión de un reportero a un fenotipo neuronal *in vitro*. Estos datos permitieron realizar la purificación de neuronas TRHérgicas a partir de un cultivo primario de hipotálamo fetal. Esta estrategia resulta de utilidad en la identificación de genes involucrados en la regulación de la expresión del gene de interés, pero es poco

viable técnicamente. Con la idea de estudiar los procesos regulatorios que pudiesen participar en la generación y/o el mantenimiento del fenotipo TRHérgico *in vivo*, se decidió determinar si la región (-776/+84 pb) del gene de TRH es capaz de conferir la expresión específica de la proteína verde fluorescente (GFP) a nivel celular. Se inició con la primera etapa de la caracterización de la expresión de GFP en el sistema nervioso central de ratones de la línea transgénica TRH-GFP. Los datos iniciales muestran que se logró obtener 3 líneas positivas, independientes, para la inserción y la expresión tejido-específica de GFP en el sistema nervioso central.

INTRODUCCION

1. El sistema neuroendócrino

El mantenimiento de la homeostásis hormonal representa un componente importante en la adaptación biológica de los organismos. En los organismos superiores, el fenómeno homeostático es controlado en parte por el sistema neuroendócrino, en el cual, el sistema nervioso y el endócrino están relacionados física y funcionalmente por el hipotálamo. Para poder integrar la gran variedad de estímulos del ambiente con los procesos que originan el control hormonal, el hipotálamo debe comunicarse con la periferia, de tal manera que depende en gran medida, de la conversión de la información sináptica a señales humorales para poder ejercer sus funciones regulatorias. Anatómicamente, los límites del hipotálamo están definidos por el tercer ventrículo y la parte ventral del cerebro. En la parte ventral existen marcas principales que delimitan el piso del hipotálamo. La más rostral corresponde al quiasma óptico, y la segunda es el tallo infundibular, una invaginación de la protuberancia llamada *cinereum tuber*, que está localizada en el piso del tercer ventrículo y que conecta al hipotálamo ventral con la pituitaria anterior a través del plexo portal; el límite caudal del hipotálamo lo establecen los núcleos mamilares (Card, 1999) (Fig. 1). El hipotálamo influye la función de los lóbulos anterior y posterior de la glándula hipófisis a través de dos sistemas neurosecretorios: 1) el sistema magnocelular de los núcleos paraventricular (NPV) y supraóptico (NSO); y 2) el sistema parvocelular del NPV y de otros núcleos. El lóbulo posterior o neurohipófisis está constituido por las terminales neuronales del sistema magnocelular. El lóbulo anterior o adenohipófisis, es controlado mediante el sistema parvocelular a través del sistema portal adenohipofisiario (Schmidt-Nielsen, 1986), (Armstrong, 1985).

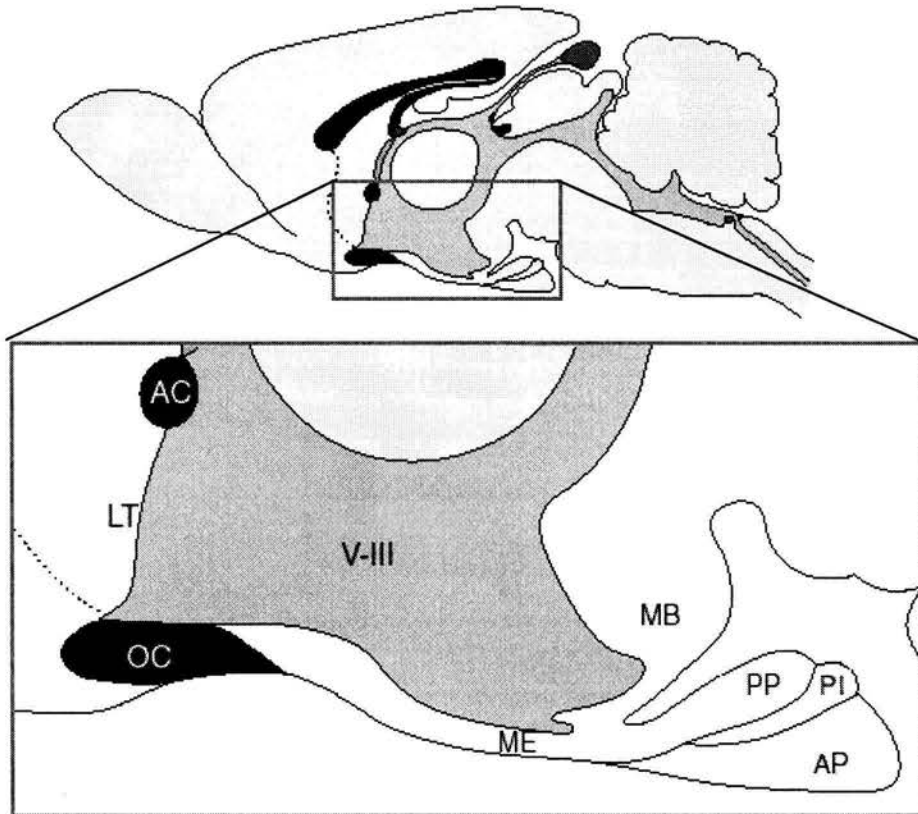


Figura 1 Localización del hipotálamo en el diencéfalo de la rata. Esquema superior: corte parasagital del cerebro. En gris se observa el sistema ventricular y en negro la materia blanca. Esquema inferior, ampliación del recuadro en el que se muestra al hipotálamo. El piso del tercer ventrículo (V-III) está formado por el quiasma óptico (OC) y la eminencia media (ME). El límite rostral del hipotálamo está definido por la lamina terminalis (LT) y el límite caudal por los cuerpos mamilares (MB). PP, hipófisis posterior; AP, hipófisis anterior; PI, hipófisis intermedia. Tomado de "The hypothalamus: An overview of regulatory systems, en: Fundamental Neuroscience.

Las neuronas parvocelulares, también conocidas como el sistema tuberohipofisial (Armstrong, 1985), influyen la secreción de las hormonas adenohipofisarias, por la liberación de factores hipofisiotrópicos de sus terminales axónicas en la eminencia media (EM; órgano circumventricular, que se extiende del piso del hipotálamo hasta la adenohipófisis). La adenohipófisis está físicamente separada del cerebro pero funcionalmente unida al hipotálamo a través de un sistema especializado de vasos capilares llamado sistema portal hipotálamo-hipofisario. El control neuroendócrino se logra gracias a que varias de las neurohormonas hipotalámicas controlan la síntesis y secreción de las hormonas adenohipofisarias, las cuales son transportadas al torrente

sanguíneo para actuar sobre receptores específicos en sus células blanco y efectuar su función reguladora (Akil, 1999).

II. Desarrollo del fenotipo peptidérgico

Podemos referirnos al fenotipo, como el conjunto de características citológicas, fisiológicas y bioquímicas que adquieren las neuronas durante el desarrollo. Para el caso de las neuronas peptidérgicas, un evento importante es la aparición o síntesis del péptido que las caracteriza (Strand, 1999), (Burbach, 2000). La identidad del neuropéptido o neurotransmisor que una neurona va a expresar, así como las estructuras que serán su blanco, son eventos que se determinan durante etapas tempranas del desarrollo. Dichos eventos son regulados por factores epigenéticos que involucran la participación de factores difusibles (mitogénicos y/o neurogénicos), proteínas con dominios de unión a DNA (homeóticas, HLH, POU, etc.) y estímulos de la matriz extracelular, por lo que las interacciones que se establezcan entre las vías de señalización inducidas por éstos, determinarán el tipo de péptido o neurotransmisor que una neurona expresará (Burbach, 2000). En relación a esto, se mencionan a continuación algunos de los factores que pueden controlar la expresión de los péptidos hipotalámicos durante el desarrollo en roedores.

III. Factores transcripcionales y el fenotipo peptidérgico hipotalámico

Actualmente existen avances sustanciales en la caracterización de varios de los procesos que controlan la generación y el mantenimiento del fenotipo peptidérgico hipotalámico (Ryan and Rosenfeld, 1997), (Michaud et al., 1998), (Michaud, 2001). Por ejemplo, en el ratón, el factor transcripcional *Brn-2* es indispensable para el establecimiento de los linajes endócrinos del hipotálamo, ya que los precursores neurales del NPV y NSO en mutantes nulos para la expresión de este factor mueren

durante la etapa de migración (Nakai et al., 1995), (Schonemann et al., 1995). Otro de los factores que se ha involucrado en los eventos tempranos del desarrollo de las neuronas del hipotálamo es el producto del gen homeótico *Otp*, el cual es necesario para la fase de diferenciación terminal de varios fenotipos peptidérgicos hipotalámicos, incluyendo al de somatostatina (SS), la vasopresina (AVP), la oxitocina (OXT) y la hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Wang and Lufkin, 2000). Se ha establecido que el factor transcripcional *Sim-1*, de la familia bHLH, forma heterodímeros con Arnt2. Este dímero, en conjunto con *Otp*, funciona para mantener la expresión de *Brn-2* durante el desarrollo de los distintos fenotipos neuronales hipotalámicos (Acampora et al., 1999), (Burbach, 2000).

Sin embargo, a pesar de que existen datos que apoyan el papel que juegan éstos factores transcripcionales en el establecimiento de los núcleos hipotalámicos y las interacciones que establecen para orquestrar la anatomía hipotalámica, aún se conoce poco sobre los procesos moleculares que determinan el inicio de la expresión génica de los péptidos en las neuronas postmitóticas del hipotálamo.

IV. Regulación del fenotipo peptidérgico hipotalámico por neurotrofinas

Durante el desarrollo del SNC las neurotrofinas están involucradas en procesos de proliferación, diferenciación, plasticidad y muerte celular, contribuyendo directa o indirectamente a la aparición de distintos fenotipos no sólo de tipo neural sino también glial (Patterson and Nawa, 1993), ((McAllister, 2001), (Snider, 1994). Las neurotrofinas comprenden un grupo de al menos cuatro proteínas estructuralmente relacionadas: el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor derivado de cerebro (BDNF), y las neurotrofinas 3 (NT-3) y 4 (NT-4). Todas ellas ejercen sus efectos a través de la unión con el receptor p75^{NTR}, como de la unión específica con receptores del tipo tirosinacinas (receptores *trk*); así, NGF activa los receptores *trk-A*, mientras que BDNF y NT-4

activan a *trk-B* y NT-3 activa a *trk-C*, aunque también puede activar a *trk-A* y *trk-B* bajo circunstancias celulares específicas (ver revisiones de (McAllister et al., 1999) y (McAllister, 2001).

Se han identificado algunas de las neurotrofinas involucradas en la diferenciación de neuronas peptidérgicas. Por ejemplo, la adición de BDNF a cultivos de neuronas postnatales (P6-P8) del NPV o núcleo supraóptico (NSO), incrementa el número de células inmunoreactivas para VP y/o OXT (Kusano et al., 1999). Respuestas similares se han observado utilizando neuronas peptidérgicas fetales de otras zonas hipotalámicas, en las que el estímulo con BDNF ó NT-3 induce el incremento en los niveles del mRNA de péptidos como somatostatina, neuropéptido Y, y pro-opiomelanocortina después de 6 DIV (Petit et al., 2002). Por otro lado, la respuesta al BDNF de cultivos primarios fetales (E17) del núcleo arcuato (ARN) hipotalámico, incluye un incremento en los niveles del mRNA de SS, del péptido (SS) y de la capacidad de las neuronas SS+ de liberarlo al medio de cultivo; en este estudio se determinó también el número total de neuronas presentes durante el período de incubación, el cual no se vió alterado, indicando que el BDNF no promueve la proliferación de fenotipos neurales (Loudes et al., 2000). De manera similar, cultivos de hipotálamo total de la misma edad embrionaria tratados con BDNF ó NT-3 por 48 horas, responden incrementando los niveles del mRNA y del péptido SS (Rage et al., 1999).

Datos como los anteriores muestran que el efecto de las neurotrofinas sobre la expresión genética de los fenotipos peptidérgicos del hipotálamo, es dependiente del tiempo de tratamiento y del tipo celular analizado.

V. Regulación hormonal del fenotipo peptidérgico hipotalámico

El cerebro tiene una red extensa de vasos capilares que le proveen de nutrientes y oxígeno, limitados por la barrera hematoencefálica. Sin embargo varios tipos de hormonas tiene la capacidad de pasar dicha barrera. Por lo tanto, no es difícil pensar que las hormonas sean factores importantes en la regulación del desarrollo y mantenimiento del fenotipo peptidérgico. Los glucocorticoides son hormonas esteroideas, de las cuales destacan el cortisol (en humanos) y la corticosterona (en murinos); ambas controlan procesos fisiológicos a través de la activación o represión de genes blanco específicos mediante la unión a los receptores citosólicos MR ó GR (revisado en: (Dostert and Heinzl, 2004), (De Kloet, 2004). Existen pocos datos del efecto que los glucocorticoides ejercen sobre fenotipos peptidérgicos. El ANF es un péptido que entre otras funciones, regula la liberación de ACTH en la hipófisis (Fink et al., 1992). Lee y colaboradores, demostraron que la dexametasona (un análogo sintético de glucocorticoides) inhibe el efecto estimulador de un agonista del receptor de dopamina sobre la expresión del factor natriurético atrial (ANF) en células hipotalámicas neonatales inmunoreactivas *in vitro* (Fink et al., 1992; Lee et al., 1995). Además de estos datos, existen evidencias sobre el efecto de la dexametasona sobre los niveles del mRNA de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en cultivos fetales hipotalámicos, los cuales se incrementan de manera dosis-dependiente (Perez-Martinez et al., 1998).

VI. El fenotipo TRHérgico

El péptido TRH, fue el primer péptido hipofisiotrópico en ser aislado. Su caracterización posterior permitió conocer más sobre las funciones que desempeña, entre ellas el control de la síntesis y liberación de tirotrópina y prolactina (revisado en (Perez-Martinez, 1999). El TRH es un tripéptido de secuencia pGlu-His-ProNH₂ derivado de un

precursor de alto peso molecular (pre-pro-TRH) que es procesado por las enzimas proconvertasas 1 y 2 (PC1, PC2) y por exopeptidasas, para originar un sustrato que la enzima peptidilglicina α -amido-monoxigenasa (PAM) transforma en el tripéptido biológicamente activo, TRH (Fig. 2; revisado en (Joseph-Bravo et al., 1998). La TRH es la hormona hipotalámica más importante involucrada en la regulación de la síntesis y secreción de la tirotrópina (TSH) por la adenohipófisis (Akil, 1999). Además, induce la síntesis y liberación de prolactina (PRL) y de la hormona de crecimiento (GH), esta última sólo en condiciones de trastornos metabólicos o endócrinos (O'Leary and O'Connor, 1995). Varios tipos neuronales que sintetizan el TRH están presentes en núcleos hipotalámicos y regiones extrahipotalámicas. La mayoría de las neuronas de TRH hipofisiotrópicas --cuyo contenido es liberado en la eminencia media-- tienen sus cuerpos celulares en el NPV. Las neuronas TRHérgicas de otras zonas hipotalámicas y extrahipotalámicas tienen funciones neurales todavía poco entendidas, pero distintas de la función hipofisiotrópica. Más aún, células con fenotipos distintos del neural pueden también sintetizar al tripéptido fuera del SNC; los ejemplos son las células secretoras de la glándula adrenal, el timo y las células de Leydig en el testículo (Montagne et al., 1999).

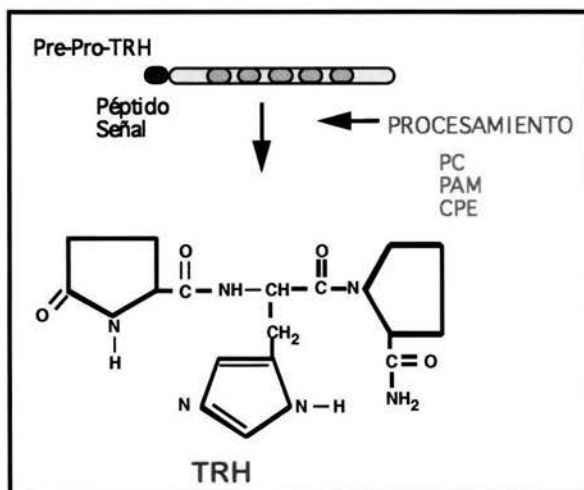
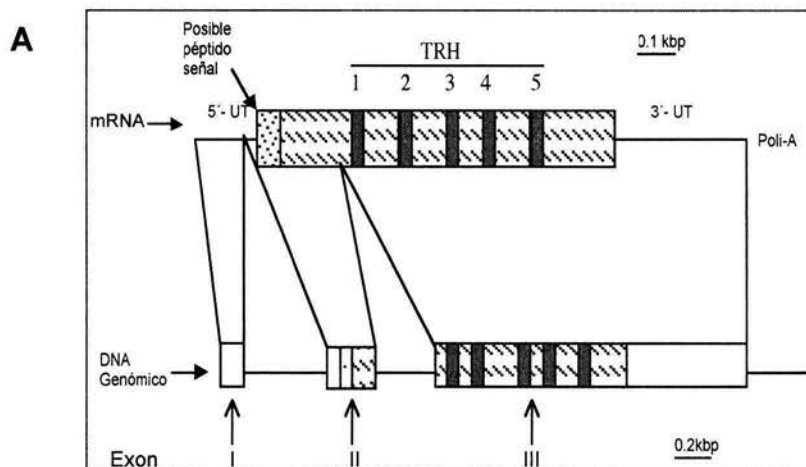


Figura 2. Ruta del procesamiento del precursor del péptido TRH. A partir de su precursor (ilustrado en amarillo). Las cinco copias del precursor inmediato del tripéptido (en color naranja), flanqueadas por un par de residuos dibásicos son cortadas por las enzimas PC1 y PC2. Posteriormente cada copia continúa por la vía de secreción y es vesicularizada. Una vez en la vesícula, los extremos carboxilos y amino-terminales son procesados, originando así al tripéptido biológicamente activo (Tomado de (Griffiths, 1983).

VII. Estructura del gene de TRH y análisis de la región regulatoria.

La caracterización del TRH ha permitido determinar que el gene que lo codifica tiene una longitud aproximada de 2.6 Kb en la rata (Lee et al., 1988) y de 3.3 Kb en el humano (Yamada et al., 1990), y está constituido por tres exones que se interrumpen por dos intrones. El producto transcripcional es un mRNA que contiene cinco o seis copias de la secuencia del precursor inmediato del tripéptido en rata o humano, respectivamente (Fig. 3A) (Lee et al., 1988), (Yamada et al., 1990). El análisis de la región 5' río arriba del sitio de inicio de la transcripción muestra que existen múltiples elementos de respuesta a factores transcripcionales, los cuales confieren a las células la capacidad de regular la expresión del gene. Por ejemplo, se ha identificado a la caja TATA a -29 pb, la caja GC a -119 pb, y sitios responsivos a receptores de glucocorticoides y hormonas tiroideas, así como a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB), que contribuyen, entre otros, a la regulación de la expresión del gene (Stevenin, 1995), (Perez-Martinez et al., 1998), (Cote-Velez et al., 2005). En la figura 3B, se muestra un esquema de las posiciones relativas de los sitios responsivos en la región regulatoria y de otros elementos que participan en el control transcripcional de TRH. Sólo una parte de estos sitios putativos tiene una comprobación experimental en distintos tipos de células.



B

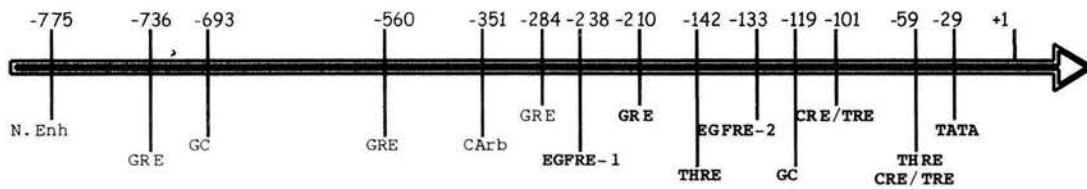


Figura 3. A) Representación gráfica de la región estructural del gene de TRH de *Rattus norvegicus* en el que se indican los tres exones que lo componen, así como el producto de su expresión, el mRNA que contiene las cinco copias del tripéptido. **B)** Esquema que ilustra las posiciones relativas de los elementos de respuesta a los factores transcripcionales de la región promotora del gen de TRH. CRE, elemento de respuesta a AMPc; GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; EGFRE, elemento de respuesta a EGF; THRE, elemento de respuesta a hormonas tiroideas; Carb, elemento cardiaco-específico; N. Enh, enhancer neuronal. Se indican en **negritas** los elementos que han sido comprobados experimentalmente (Tomado de: Pérez-Martínez et al., 1999; Lee et al., 1988)

En un intento por identificar las secuencias responsables de la especificidad tisular del control transcripcional del gene de TRH *in vivo*, Balkan y colaboradores (Balkan et al., 1998) generaron líneas de ratones transgénicos que expresan al reportero luciferasa bajo el control de varios segmentos de la región promotora del gene de TRH de rata (vector pNASSTRH-LUC). Ellos observaron que la región del primer exón que se extiende desde el sitio de inicio de transcripción a +84 pb restringe la expresión del reportero a las zonas de producción endógena de TRH; es decir, confiere tejido-especificidad; mientras que la inclusión de la región que se extiende de -1 a -776 pb modifica el nivel de expresión *in vivo* del reportero. Esta región regulatoria (-776/+84) fué subclonada en otro vector conteniendo el cDNA de GFP (vector phr-TRH/GFP). La transfección de este vector en neuronas fetales hipotalámicas en cultivo primario, permitió, por un lado, observar directamente a las neuronas TRH+ por microscopia de fluorescencia; y por otro, aislarlas por medio de la técnica "fluorescence activated cell sorting" (FACS) (Guerra-Crespo et al., 2003). Las células aisladas sirvieron de base para un análisis parcial del transcriptoma del fenotipo TRHérgico y permitieron la identificación de nuevos genes que pudieran tener un papel en el establecimiento del

fenotipo TRHérgico. La caracterización funcional de éstos, esta en curso (Magdalena Guerra, Tesis de doctorado, 2004).

DESARROLLO DEL FENOTIPO TRHERGICO HIPOTALAMICO;

JUSTIFICACION

En el diencéfalo de rata las células que expresan el mRNA de TRH son detectadas por vez primera en el hipotálamo lateral al día fetal 14 (E14), en el núcleo ventromedial el día E15 y en el núcleo paraventricular el día E16, mientras que en el área preóptica el día E17. Debido al importante papel que tienen las neurotrofinas durante el desarrollo del SNC de los vertebrados (McAllister, 2001), (Patterson and Nawa, 1993), varios grupos de investigación han tratado de dilucidar el/los mecanismo(s) utilizado(s) por estas moléculas en el establecimiento del fenotipo neural, incluyendo el fenotipo peptidérgico. Datos previos obtenidos en nuestro laboratorio han permitido realizar avances sustanciales en cuanto al conocimiento del efecto que los factores neurotróficos ejercen sobre el establecimiento del fenotipo TRHérgico. Por un lado, la ontogenia de la expresión *in vivo* del mRNA del receptor para BDNF, trk-B, indica que su expresión en la región hipotalámica se inicia por lo menos 48 horas antes de que el mRNA de TRH sea detectable por hibridación *in situ* en el NPV (Tesis de maestría, Antonio González, 2001), sugiriendo que el BDNF pudiese estar involucrado en la diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico hipotalámico. En este sentido, se demostró que una población hipotalámica de neuronas TRHérgicas postmitóticas fetales (E17) *in vitro*, responde al estímulo con BDNF incrementando los niveles del mRNA de TRH, efecto que es dependiente del tiempo de tratamiento e independiente de la promoción de la sobrevivencia, ya que el número de neuronas que coexpresan trk-B y TRH no cambia después de la inducción con la neurotrofina; además, dicho efecto no se observa en el cultivo al ser estimulado con NGF y/o NT3 (Guerra-Crespo et al., 2001). Se sabe, por otro lado, que en ratas adultas las neuronas TRHérgicas del NPV expresan el trk-B (Uribe et al., datos no publicados). Aunado a esto, tenemos que el efecto de las neurotrofinas depende del contexto temporal. Por ejemplo, el BDNF puede

regular la expresión de SS , NPY y pro-opiomelanocortina (POMC) en cultivos de neuronas hipotalámicas de entre 6DIV a 14DIV (Petit et al., 2002). Mientras que en neuronas corticales fetales, el BDNF induce protección contra la muerte celular inducida por acumulación de proteínas en el retículo endoplásmico (Shimoke et al., 2004). Tomando esto en consideración, se decidió realizar experimentos que permitieran determinar si el efecto del BDNF sobre las neuronas hipotalámicas neonatales era similar al observado en el hipotálamo fetal a nivel de la regulación transcripcional del gene de TRH. Además, se decidió probar la hipótesis de que las neuronas TRHérgicas del NPV neonatal, son las principales responsables de dicha respuesta al estímulo con BDNF; cabe aclarar que, si bien las neuronas neonatales de TRH ya han establecido sus contactos sinápticos, el eje neurohormonal aún es inmaduro desde el punto de vista fisiológico. Para realizar estos ensayos se aprovechó la optimización de la disección del NPV neonatal realizada por Arlene García (ver materiales y métodos) (Tesis de Licenciatura 2002).

Por otro lado, uno de los principales inconvenientes de utilizar modelos *in vitro* para tratar de explicar los mecanismos implicados en la regulación del desarrollo de fenotipos celulares, es la dificultad para extrapolar estos datos a lo que ocurre *in vivo*. El análisis de modelos neuronales *in vivo* es complejo ya que frecuentemente, en el cerebro, las células bajo estudio conforman una minoría difícilmente identificable. Para poder identificar fácilmente un fenotipo neural en particular, una de las estrategias es la utilización de los modelos transgénicos utilizando un gene reportero como β -galactosidasa (de Wet et al., 1987), (Brasier et al., 1989) o la proteína verde fluorescente (Chalfie et al., 1994), bajo el control del promotor que controla la expresión del gene asociado al fenotipo estudiado. Los reporteros genéticos son comúnmente utilizados en biología celular para estudiar la expresión de genes y otros eventos intracelulares acoplados, como actividad de receptores y transducción de señales, entre

otros, ya que usualmente no requieren de modificaciones postraduccionales para su actividad. Esto los hace de gran utilidad en el desvelo de distintos fenómenos implicados en la maduración y mantenimiento de los distintos fenotipos neurales en distintas etapas del desarrollo. Utilizando ratones transgénicos que expresan la luciferasa bajo el control de distintos promotores del gene de TRH, Balkan y colaboradores (Balkan et al., 1998), demostraron que la región que comprende de -776 / +84 pb es necesaria para conferir tejido-especificidad en la actividad de luciferasa en estos ratones. Sin embargo, la actividad del reportero a nivel celular no está definida en este modelo, por lo que no fue posible determinar qué grupos celulares son los responsables de la actividad enzimática observada. Existe, sin embargo, una alternativa para poder identificar a nivel tisular las neuronas TRHérgicas: la generación de un animal transgénico que exprese el gene reportero GFP bajo el control de la región promotora usada en el reporte de Balkan y colaboradores. Este modelo sería el punto de partida para realizar estudios *in vivo* que nos permitan generar nuevos datos sobre el establecimiento así como el proceso de diferenciación del fenotipo TRHérgico.

Recientemente, se logró enriquecer la población de neuronas TRHérgicas a partir de cultivos hipotalámicos fetales transfectados con el vector de expresión que contiene el DNA complementario (cDNA) de GFP bajo el control de la región promotora (-776 a +84 pb), lo que sugiere que esta región confiere especificidad celular de la expresión del reportero *in vitro* (Guerra-Crespo et al., 2003), lo que nos indujo a utilizar esta construcción para generar las líneas transgénicas

OBJETIVOS

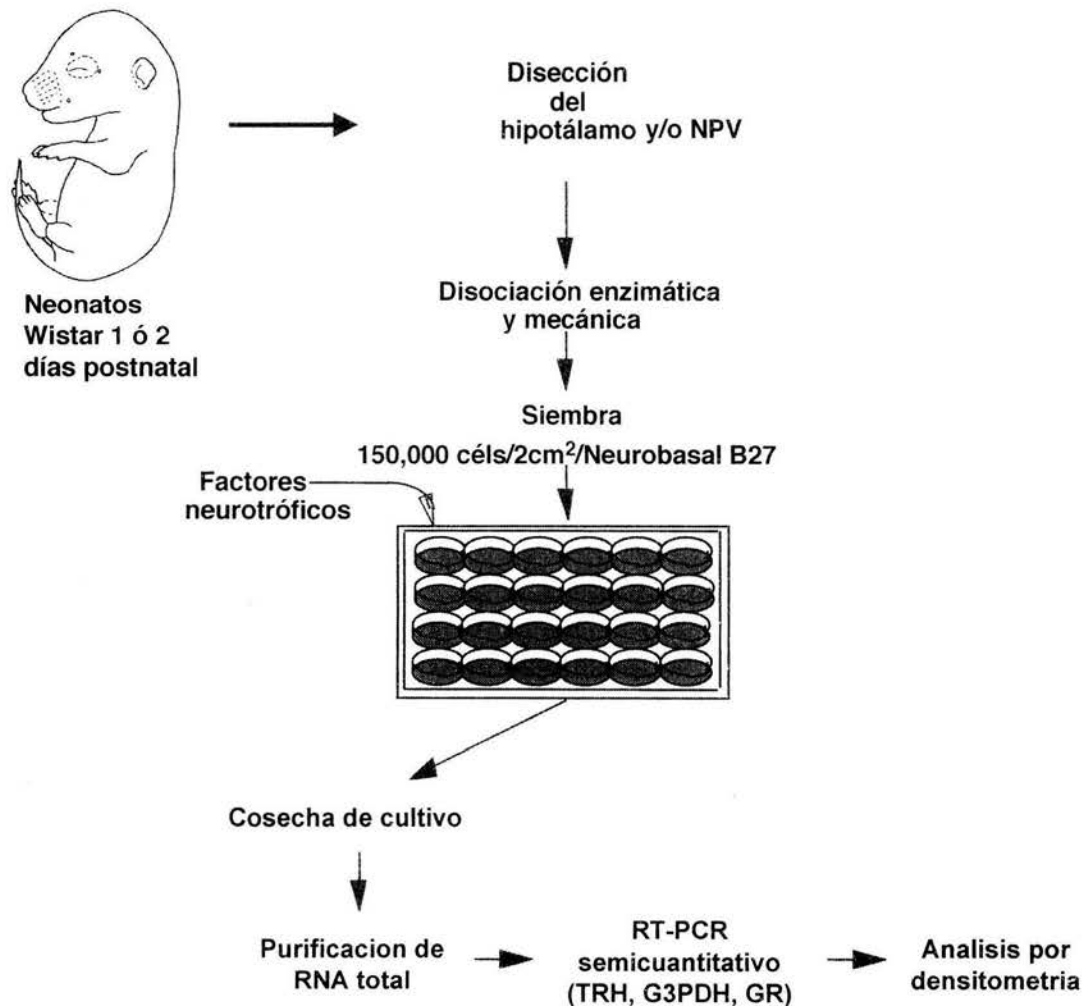
- I. Determinar el efecto temporal de BDNF sobre la expresión del mRNA de TRH en neuronas hipotalámicas neonatales *in vitro*.
- II. Determinar el papel del BDNF sobre la expresión del mRNA de TRH en neuronas del NPV neonatal *in vitro*.
- III. Caracterizar líneas de ratones transgénicos que expresen la GFP bajo el control del promotor (-776/+84 pb) del gene de TRH, en el sistema nervioso central.

CAPITULO I

IMPACTO DEL BDNF SOBRE EL FENOTIPO TRHERGICO HIPOTALAMICO

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

OBJETIVOS I y II



Ratas macho neonatos de la variedad Wistar fueron utilizadas para obtener el hipotálamo ó el NPV; éstos fueron enzimática y mecánicamente disociados. Las células fueron sembradas en placas de cultivo a la densidad especificada y estimuladas con la neurotrofina BDNF durante 4 ó hasta 12 días *in vitro* (DIV). El RNA total se extrajo y cuantificó para realizar RT-PCR y un análisis densitométrico se utilizó para la valoración semicuantitativa del mRNA de TRH o de GR (receptor de glucocorticoides; un control de la precisión de la disección del NPV). El mRNA de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) se utilizó para normalizar la cantidad de mRNA analizado.

MATERIALES Y METODOS. OBJETIVOS I Y II

Cultivo primario

Los cultivos se realizaron con hipotálamos ó NPVs de ratas macho de la variedad Wistar de 0 a dos días postnatales (P0-P2) de edad, de acuerdo con un protocolo modificado (Arlene García Vázquez, Tesis licenciatura, Agosto 2002), del reportado previamente para cultivo de neuronas hipocampales de ratas postnatales (Brewer, 1997). Platos de cultivo de 24 pozos fueron incubados con 500 μ l de poli-D-lisina (0.03 mg/ml) como sustrato de anclaje para las células, durante dos horas como mínimo a 37 °C. Se lavaron dos veces con solución Hank's (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 440 μ M, NaH_2PO_4 750 μ M, D-(+) glucosa 5 mM) y se mantuvieron con 500 μ l de la misma solución hasta el momento de la siembra. Se utilizó el medio Neurobasal (NB, GIBCO), adicionado con el suplemento B27 (un complemento libre de suero que contiene básicamente ácidos grasos, antioxidantes, vitaminas y hormonas; concentración final 1X, GIBCO), L-glutamina 0.5 mM, antibiótico-antimicótico 1 % y 3×10^{-9} M de 17- β -estradiol (SIGMA); nos referimos a este medio como NB-B27. Los neonatos se decapitaron con ayuda de un estuche de disección en campana de flujo laminar para extraer el cerebro. Colocando el cerebro con la parte ventral hacia arriba y usando los surcos laterales, el quiasma óptico y los cuerpos mamilares como referencia, se disecó el hipotálamo con cortes de aproximadamente 3 mm de profundidad. Los hipotálamos se depositaron en un tubo estéril de 1.5 ml conteniendo NB-B27 (máximo 12 por tubo). Posteriormente se lavaron dos veces con NB-B27 para eliminar la sangre y con tijeras pequeñas se cortaron los hipotálamos en trozos pequeños.

Para la disección del NPV, se procedió de acuerdo al método optimizado por Arlene Vázquez. Brevemente, el cerebro obtenido de los neonatos se depositó en un molde metálico para cerebros de ratón adulto (30 g) con divisiones coronales de 1 mm (TED

PELLA, INC.), quedando la parte dorsal del cerebro en contacto con el molde. Se realizó un corte anterior al término de la apertura del quiasma óptico y otro hacia la parte caudal, con ayuda de una navaja estéril (Gillette). La rebanada de 1 mm adherida a la navaja se colocó bajo microscopio estereoscópico. Con la ayuda de un sacabocados de 1 mm de diámetro se extrajo el NPV. Este se ubica aproximadamente 1 mm dorsal al segundo tercio del largo del tercer ventrículo. Los NPVs (un máximo de 20 NPVs) obtenidos se colectaron en medio NB-B27 en un tubo de 1.5 ml y fueron transferidos a un tubo con 1 ml de medio NB-B27 para remover los restos de tejido hemático. Enseguida se retiró la mayor cantidad de medio con ayuda de una pipeta Pasteur para cortar el tejido en trozos pequeños.

Los tejidos (hipotálamos ó NPVs) fueron incubados por separado en una solución de papaína (Worthington, Biochem. Corp.) resuspendida en medio NB-B27 (6 mg/ml), durante 30 min a 30 °C en agitación a 170 x g. Terminado este tiempo, se agregaron 2 ml de NB-B27 a cada tubo y se dispersó el tejido mecánicamente con ayuda de pipetas Pasteur con diámetros descendentes (10 veces cada vez). Una vez que el tejido sedimentó, el sobrenadante se depositó en un tubo nuevo estéril de 5 ml. Al tejido sedimentado se le agregaron 2 ml de NB-B27 y se dispersó como antes. El sobrenadante se mezcló con el obtenido anteriormente y la operación se repitió una vez más. Los sobrenadantes (6 ml) se centrifugaron a 1500 x g a temperatura ambiente (TA) por 5 min. La pastilla de células se resuspendió en 1.5 ml de NB-B27 y la viabilidad se determinó por exclusión del colorante azul de tripano.

La siembra de las placas de cultivo se realizó a una densidad de 150,000 células/pozo con 500 μ l de medio NB-B27. El BDNF se agregó al momento de la siembra a una concentración de 50 ng/ml. Las células se cultivaron a 37 °C en condiciones de alta humedad, en una atmósfera con 93 % de aire y 7 % de CO₂. Las células fueron mantenidas con el estímulo de BDNF hasta el cuarto día in vitro (4DIV) o hasta el 12

DIV, haciendo cambio de medio parcial cada dos días a partir del 4 DIV, adicionando o no con el medio fresco, BDNF (50 ng/ml), según el paradigma experimental.

RT-PCR

Para la purificación del RNA total, se decidió juntar al menos las células de 3 pozos, con la finalidad de obtener suficiente material para el procedimiento. A partir del 4 DIV y consecutivamente cada dos días, hasta el 12 DIV, se retiró todo el medio de los pozos y se adicionó al pozo 1 ml del reactivo para extracción de RNA, STAT-60 (TEL-TEST INC.) con el que las células fueron raspadas a temperatura ambiente (TA). Las células así obtenidas se mantuvieron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Para extraer el RNA, se procedió de acuerdo con el protocolo sugerido por el fabricante. Brevemente, las células resuspendidas en STAT-60 se descongelaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez descongeladas se homogeneizaron por vórtex e incubaron durante 5 min a TA. Seguido se adicionaron $200\text{ }\mu\text{l}$ de cloroformo (Baker) y se mezcló durante 15 segundos por vórtex; posteriormente se incubaron las muestras por 3 min a TA. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 x g durante 15 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se recuperó la fase acuosa en un tubo de 1.5 ml y se le agregaron $500\text{ }\mu\text{l}$ de isopropanol (Baker) para dejar precipitando toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Al día siguiente las muestras fueron descongeladas y centrifugadas como antes. La pastilla de RNA se lavó entonces con 1 ml de etanol 75 % frío y se centrifugó por 12 min a 2000 x g a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se secó al aire. La pastilla se resuspendió con agua tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC), para después cuantificar el RNA por espectrofotometría. La relación de las densidades ópticas a $260\text{ nm}/280\text{ nm}$ fue usada como parámetro de pureza.

Para obtener el cDNA de cada muestra, 1 μg de RNA total de cada una se mezcló con agua suficiente para llevarlo a 12 μl . El RNA fue transcrito en un volumen final de 32 μl , conteniendo lo siguiente: amortiguador de reacción 1X (Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, KCl 75 mM, MgCl_2 3 mM); 10 mM DTT; 200 μM dNTPs; 500 ng/ μl oligo-dT; y 100 unidades de la enzima transcriptasa reversa (RT) (M-MLV, Invitrogen). La reacción se incubó en un baño de agua a 37 °C durante 2 horas. El cDNA obtenido se almacenó a -20 °C hasta su uso, o fue utilizado inmediatamente para amplificar los cDNAs de TRH, G3PDH y GR.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 50 μl , que contenía: 6 μl del producto de RT, buffer de reacción para PCR (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM, pH 8.3) (Biotecnologías Universitarias); 1.5 mM MgCl_2 ; 200 μM dNTPs; 5 U/ μl Taq polimerasa (Biotecnologías Universitarias) y 20 picomolas/ μl de cualquiera de los siguientes oligonucleótidos: TRH sentido, 5' GGACCTTGGTTGCTGTCGACTCTGGCTTTG 3'; antisentido, 5' ATGACTCCTGCTCAGGGTCATCTAGAAGGGCT 3', producto de 700 pb (Pérez-Martínez et al., 1998); GR sentido: 5' AAAAAGCACATCACACATAAATCTG 3'; antisentido: 5' TAAATAAGAGGGAGCAAACACTACTGG 3', producto de 639 pb (Arlene García, tesis licenciatura, 2002); G3PDH sentido: 5'TGAAGGTCGGTGTCAAACGGA TTTGGC3', antisentido: 5'CATGTAGGCCA TGAGGTCCACCAC3', producto de 983 pb (Perez-Martinez et al., 2001). La temperatura de alineamiento se estableció en 60 °C para el GR, la G3PDH y el TRH. Cada ciclo de la PCR consistió en un paso de desnaturalización a 95 °C por 1.15 min, un paso de alineación de los iniciadores a 60 °C por 1 min, un paso de extensión a 72 °C por 1 min; estos pasos fueron repetidos por 27 ó 23 ciclos para GR/TRH ó G3PDH, respectivamente, con una extensión al final de 10 min a 72 °C. Cada amplificación se realizó en tubos separados. Del producto de la PCR, se sometieron 20 μl a electroforesis en gel de agarosa (Ultra-pure, Bio-Rad) al 2 %, el

cual fue teñido con bromuro de etidio. Las bandas se cuantificaron por densitometría en un multianalizador de imágenes (Fluor-S Multimager, Bio-Rad). En todos los casos la intensidad de la señal detectada para el cDNA de TRH ó GR fue dividida por la intensidad de la señal obtenida para G3PDH; por lo tanto, las relaciones entre estos son las reportadas en los resultados.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el programa ANOVA, utilizando la prueba *post-hoc* de Fisher. Los datos se presentan como el promedio \pm error estándar. En general corresponden a 2 ó 3 experimentos independientes por triplicado o cuadruplicado.

Falta página

N° 25

niveles del mRNA de TRH, similar al observado en los cultivos primarios de hipotálamo E17. De manera interesante, observamos que el efecto estimulante del BDNF sobre la expresión de TRH, disminuye significativamente en relación con el tiempo de cultivo, ya que observamos una disminución del efecto 48 hrs después del término del estímulo de 4 DIV, y una reversión a las concentraciones basales del mRNA desde el día 10 de cultivo (Fig. 4).

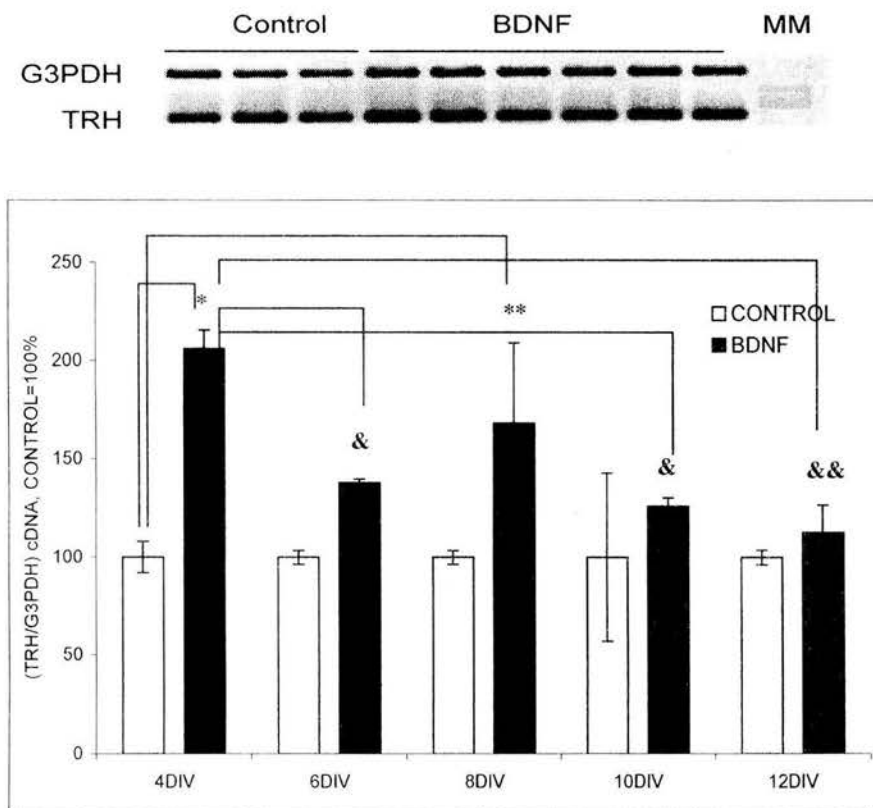


Figura 4. Efecto del BDNF por 4DIV sobre los niveles del mRNA de TRH en cultivos hipotalámicos. RT-PCR del gene de TRH. En el panel superior aparece una imagen representativa de la electroforésis de los productos de amplificación de la reacción. En el panel inferior está la cuantificación de las bandas observadas en respuesta a la exposición transitoria (4DIV) al BDNF sobre las neuronas hipotalámicas neonatales a diferentes etapas del cultivo (hasta 12 DIV). Se muestra el promedio de 1 cultivo por triplicado (\pm el error estándar). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs control 4 DIV; & $p < 0.01$, && $p < 0.001$ vs BDNF 4 DIV.

Este resultado sugirió que las neuronas en cultivo podrían requerir del mantenimiento del estímulo con BDNF durante un período de tiempo mayor para poder observar una regulación sostenida, similar a la observada durante los primeros 4 días de cultivo.

Para probar esta hipótesis, se mantuvo el cultivo hipotalámico con un estímulo sostenido durante 12 DIV. El análisis de los niveles de RNA total por espectroscopia, mostró que a lo largo del período de cultivo, estos se mantuvieron estables, tanto en los platos controles como en los experimentales (ver apéndice, Fig. S2). De manera similar, la morfología de las células no sufrió cambios aparentes por el tratamiento con la neurotrofina (no mostrado). El análisis densitométrico de los productos de RT-PCR de este cultivo mostró que el estímulo constante indujo un incremento en los niveles del mRNA de TRH al cuarto día de cultivo como se esperaba, de acuerdo a los resultados de la figura 4 . Pero además observamos que dicho efecto no se mantuvo a lo largo del cultivo, indicando una posible desensibilización de las células a la inducción con BDNF. Esto es, el mantenimiento del estímulo en el medio de cultivo es efectivo sólo durante los primeros 8 DIV; después el BDNF pierde su eficacia y la expresión del gene regresa a sus niveles basales (Fig. 5).

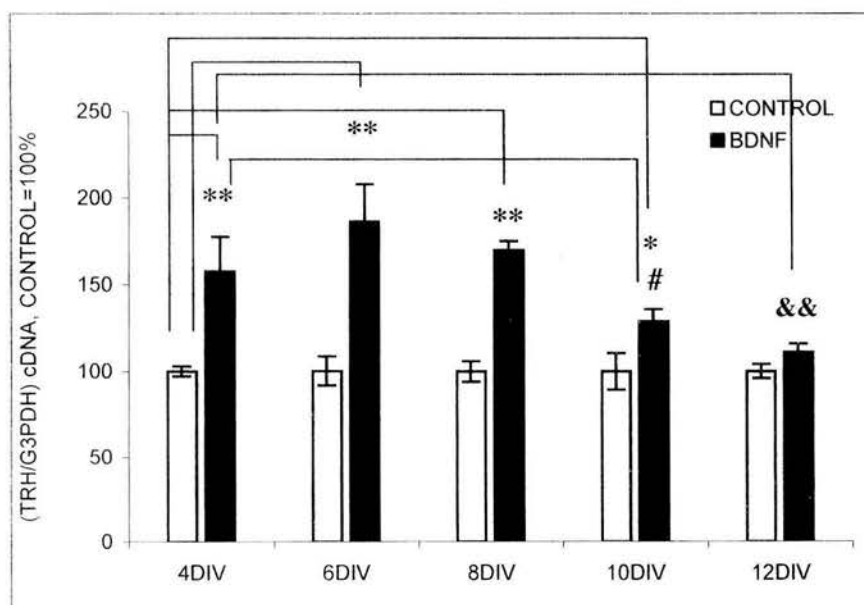


Figura 5. Cinética de los niveles del mRNA de TRH en las neuronas hipotalámicas neonatales en respuesta a la exposición continua al BDNF. Se muestra el promedio de 2 cultivos independientes por triplicado (\pm error estándar). ** $p < 0.001$, * $p < 0.05$ vs control 4DIV; # $p < 0.05$ vs BDNF 4DIV; && $p < 0.001$ vs BDNF 4DIV.

Efecto del BDNF sobre las neuronas hipofisiotrópicas del NPV.

Uno de los principales centros de control del eje tiroideo, como ya se mencionó antes, es el NPV. Para obtener información sobre el efecto que el BDNF ejerce sobre las neuronas hipofisiotrópicas de TRH, se decidió mantener en cultivo neuronas neonatales aisladas de este núcleo. La cantidad promedio de neuronas obtenidas para el cultivo primario de NPV fue de $45,000 \pm 66$ células/NPV ($n= 4$) (10% de la cantidad obtenida para un hipotálamo) cuya viabilidad determinada por exclusión del colorante azul de tripano fue de 90 ± 2 % ($n= 4$) respecto del total de células. Estas células se mantuvieron en las mismas condiciones que las del cultivo hipotalámico neonatal ya descrito. Se decidió mantener este cultivo durante solamente 4 DIV, ya que el efecto máximo del BDNF sobre los niveles de expresión del gene de TRH se observó en esta ventana de tiempo. No hubo efectos significativos entre los niveles de RNA total en los pozos control y pozos tratados con BDNF (ver apéndice, Fig. S3).

Observamos --a pesar de algunas dificultades de eficiencia al momento de la amplificación-- que los niveles de expresión en el cultivo de NPV, del receptor de glucocorticoides (GR), un marcador de la eficiencia de disección (el NPV es el único núcleo hipotalámico que lo expresa en esta etapa de desarrollo; (Sakurai et al., 1998), se incrementaron respecto del cultivo de hipotálamo total (datos no mostrados). Este dato confirmó la precisión en la disección del NPV. En la figura 6A se puede observar que los niveles del mRNA de TRH del cultivo de NPV estimulado con BDNF, se elevan de forma similar al cultivo hipotalámico. Cuando se compara el incremento entre ambas regiones, la respuesta es mayor en el NPV, lo cual indica que las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas pueden ser las principales responsables del incremento observado en el hipotálamo total. En la figura 6B, se muestra la morfología al microscopio de las neuronas del NPV al momento de la cosecha.

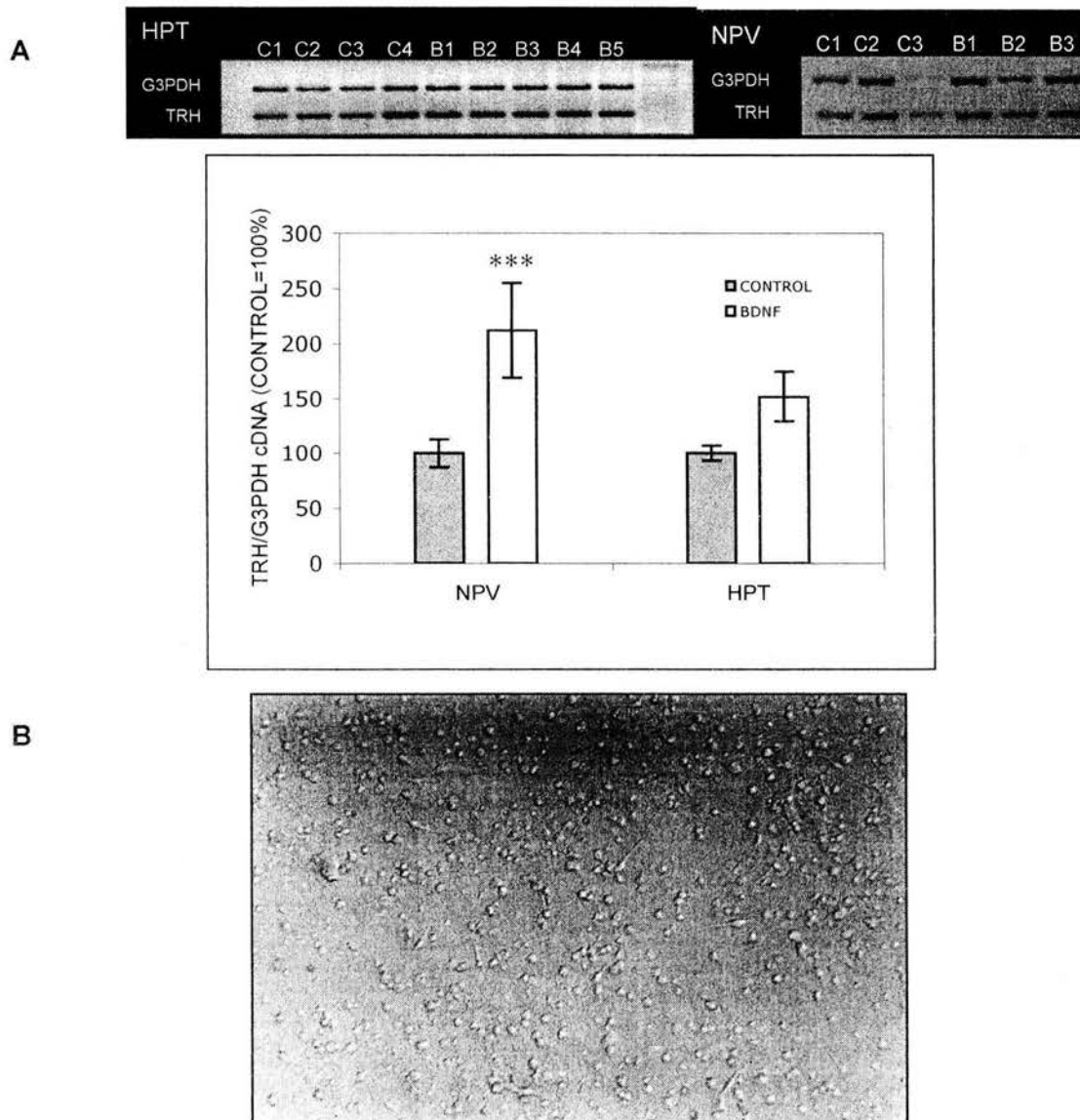


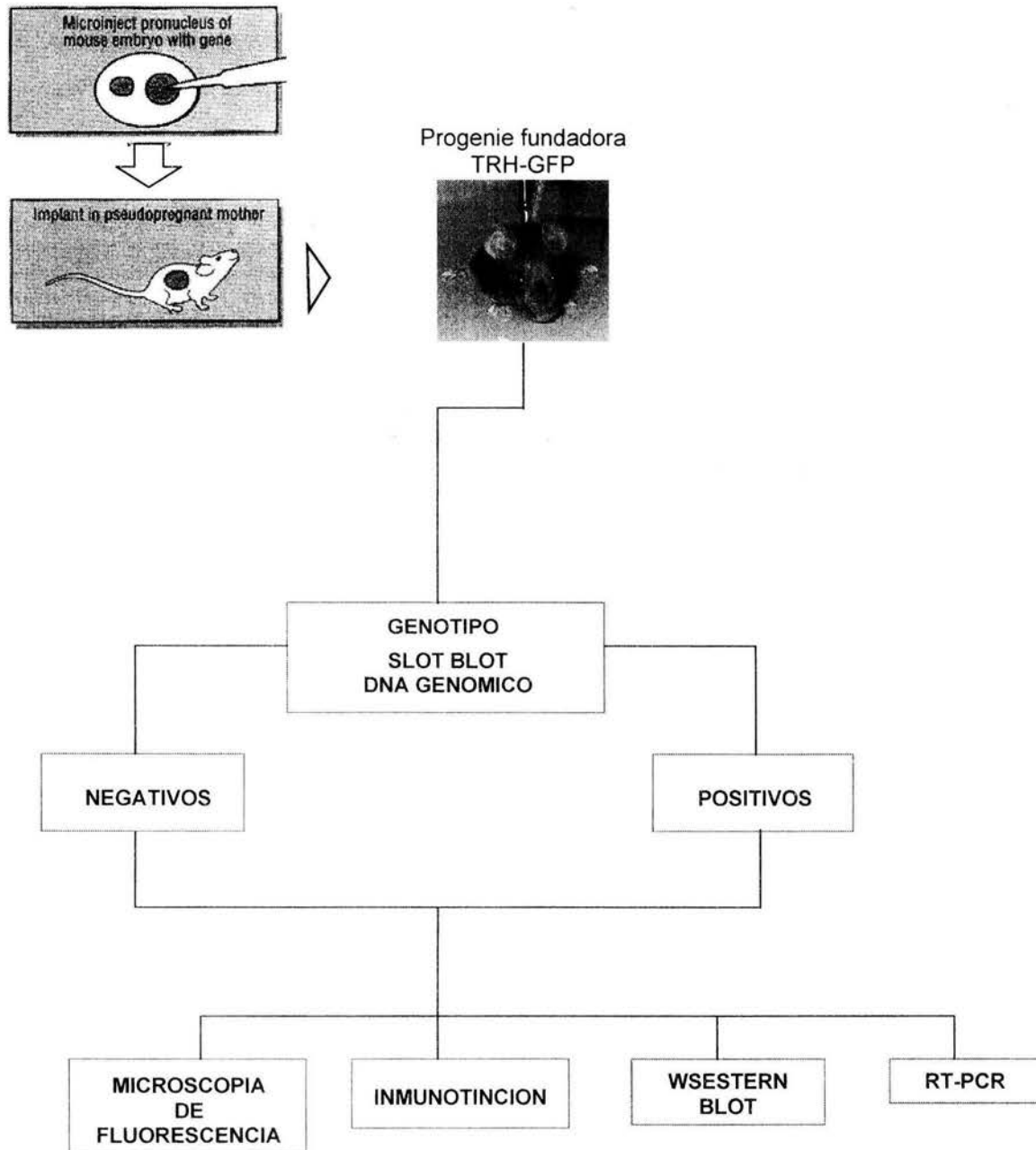
Figura 6. A. Efecto del BDNF sobre los niveles del mRNA de TRH en las neuronas del NPV e hipotálamo neonatales, en respuesta a la exposición durante 4 DIV con BDNF. En el panel **A**, aparecen fotografías representativas de las electroforésis de los productos de amplificación, TRH y el control endógeno G3PDH, tanto de hipotálamo (HPT) como de núcleo paraventricular (NPV). C1-C4, replicas de controles; B1-B5, replicas de inducción con BDNF, así como la cuantificación densitométrica correspondiente. Se muestran los promedios de 4 cultivos independientes por triplicado o cuadruplicado (\pm error estándar). *** $p < 0.01$ vs control. **B.** microfotografía de la monocapa de células control del NPV al 4 DIV. Ampliación original 10X.

CAPITULO II

CARACTERIZACION DE LA EXPRESION DE GFP EN EL SNC DE RATONES
TRANSGENICOS TRH-GFP

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL OBJETIVO III

GENERACIÓN y CARACTERIZACION DEL
RATÓN TRANSGÉNICO TRH-GFP



MATERIALES Y METODOS

OBJETIVO III

Animales

Se utilizaron ratones de distintas edades de las cepas CD1, B6C3, y C57BL/6. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura y humedad constantes con ciclos de 12/12 hrs luz y oscuridad, respectivamente, y se les alimentó *ad libitum*. Las cepas B6C3 y C57BL/6 fueron mantenidas en el bioterio de la Universidad de Vermont (EUA). Con excepción de ratones postnatales de 8 días (P08), los cuales fueron sacrificados por decapitación directa, la mayoría de los animales fueron sacrificados por dislocación cervical o sedados con pentobarbital (50 mg/kg) y posteriormente decapitados.

Generación de líneas de ratones transgénicos TRH-GFP

Esta parte del trabajo experimental fue realizada en el departamento de Anatomía y Neurobiología y la unidad de transgénicos del Colegio de Medicina de la Universidad de Vermont por la Dra. Leonor Pérez-Martínez, colaboradora del grupo de trabajo.

1. Construcción del fragmento de DNA para la microinyección

En un estudio previo se demostró que un segmento que va de -776/+84 pb de la región promotora del gen de TRH de rata confiere tejido-especificidad para la actividad del gen reportero luciferasa en ratones transgénicos (Balkan et al., 1998). El vector utilizado para este trabajo, PNASSTRH-Luc (ver apéndice, Fig. S4A), fue amablemente donado por el Dr. Balkan. De este vector se extrajo el fragmento correspondiente a la región promotora y se subclonó en los sitios EcoRI-BamHI del vector de expresión pACT2 (ver apéndice Fig. S4B) (Clontech). Posteriormente, el promotor se escindió del vector pACT2 digiriéndolo con las enzimas SacI y BamHI lo que generó extremos cohesivos, y

fue introducido río arriba de la secuencia codificante para la proteína verde fluorescente (eGFP) entre los sitios de restricción *SacI* y *BamHI* del sitio múltiple de clonación (MCS) del vector *phrGFP* (ver apéndice, Fig. S4C) (Stratagene). El fragmento que contenía la región promotora de TRH y la secuencia codificante de EGFP se purificó del vector *phrGFP* por digestión con las enzimas *SacI* y *KpnI* que generan extremos cohesivos, por lo que se hizo relleno de secuencia utilizando la enzima Klenow, para clonar posteriormente el fragmento rasurado, en el sitio *EcoRV* del vector *pBluescript II KS+/hGH* (*PBIKS+/hGH*), el cual contiene la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (Chow et al., 1999) (Fig. S4D). La orientación del fragmento se verificó por digestión con la enzima *Sal I*.

El vector se secuenció para corroborar que el promotor de TRH se encontrara en fase con la secuencia de GFP y la señal de poliadenilación. Para ello, se diseñaron tres oligonucleótidos, el primero de ellos (TCTAGAACTAGTGGATC), correspondiente a la región 5' del vector *PBKSII+/hGH*. Con él se secuenció la región 5' del fragmento promotor de TRH. El segundo correspondió a la región 3' del promotor de TRH (TGCAGAGCTTTCCAAGA) y el tercero a la región 5' (TGTCTCAGCTGAAGCCA). Se verificó por secuenciación que el promotor de TRH estuviera completo y en fase con la secuencia de GFP.

El fragmento de DNA conteniendo el promotor de TRH fusionado a GFP y la señal de poliadenilación de hGH (ver apéndice, Fig. S5), se escindió del vector *PBIKS+/hGH* digiriendo con las enzimas *SacII* y *KpnI*, se purificó por electroelución y a través de columnas "Elutip-d" (Qiagen) y se resuspendió en buffer de inyección (0.01M Tris pH 7.4, 100 μ M EDTA). La pureza y concentración del fragmento se corroboraron electroforésis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

2. Microinyección

Ratones hembras donadoras de óvulos se indujeron a sobre-ovular por inyección de suero de yegua preñada (5 UI/ratón). Dos días después, se les inyectó hormona gonadotropina coriónica humana (5 UI/ratón) y se colocaron con un ratón macho fértil. Al tercer día, óvulos fertilizados tomados de hembras con tapón vaginal se extrajeron de los ovarios y se incubaron a 37 °C por 1-2 hrs para permitir la expansión del pronúcleo. El fragmento de DNA purificado conteniendo el promotor de TRH la GFP y la señal de poliadenilación de hGH, se microinyectó (10 ng/ μ l) en los óvulos fertilizados. Aproximadamente 20 óvulos microinyectados fueron transferidos a una hembra “adoptiva” que previamente había sido expuesta con un ratón macho infértil (vasectomizado) (Hogan, 1994). Se mantuvieron dos hembras “adoptivas” de las cuales resultaron 36 crías. Los ratones fundadores están en la cepa B6C3 (C3H x C57BL/6), los cuales se cruzaron con ratones de la cepa C57BL/6 para generar progenie y checar la expresión de GFP en el SNC. La inserción del transgene tanto en los fundadores como en su progenie se verificó por Southern blot (slot-blot).

Determinación del genotipo por slot-blot

a) Extracción de DNA genómico

Para determinar la inserción del transgene en el genoma de los ratones se utilizó DNA genómico extraído a partir de biopsias de las colas. Las biopsias fueron obtenidas a los 5 días postnatales en los laboratorios de la compañía “Charles River” (Boston, MA); éstas se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento. La extracción de DNA se realizó utilizando un “kit” de extracción para DNA (Stratagene). Brevemente, las biopsias se incubaron en 500 μ l de solución 2 a 56 °C con 2 μ l de pronasa toda la noche. Al día siguiente, se agregaron 200 μ l de solución 3 a cada tubo antes de centrifugar por 30 min a 10,000 x g a TA. Se recuperó el sobrenadante para agregar 2 μ l de RNAsa e incubar

a 37 °C durante 30 min y después precipitar con etanol 100 %. La mezcla se centrifugó como antes para después lavar con etanol 75 %. Una vez lavado, el DNA se resuspendió en buffer 1X TE (Tris-EDTA) y se cuantificó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 y 280 nm. La relación 260/280 nm se usó como control de pureza.

b) Hibridación

Para realizar el ensayo de hibridación se utilizaron 10 µg de DNA genómico. El DNA se diluyó a un volumen final de 200 µl con agua y se incubó a TA durante 15 min con NaOH 4 M; seguido se agregó acetato de sodio 2 M frío. Aparte, una membrana de nitrocelulosa se equilibró con 300 µl de acetato de amonio 1 M. Las muestras se cargaron en los pozos (volumen final de 400 µl) y se deshidrataron por vacío, antes de ser entrecruzadas con luz UV (Stratalinker). La membrana se incubó en buffer de prehibridación (100 µg de DNA desnaturalizado de espermatozoos de salmón y 10 ml de buffer fosfatos (PB) a 65 °C en agitación durante 2 hrs.

Por otro lado, una sonda de 500 pb correspondiente a la región 3' no transcrita del gene de la hormona de crecimiento humana (hGH) y una sonda con secuencia "random" como control, se marcaron con ³²P-dCTP usando 5 U/µl de la DNA polimerasa Klenow. La membrana prehibridada se incubó con las sondas marcadas en agitación toda la noche a 65 °C. Al día siguiente la membrana se lavó con SSC 3X/SDS 0.1 % durante 30 min a TA. Seguido, se lavó un par de veces con 0.1X SSC/0.1 % SDS. Después del último lavado, la membrana se expuso a un film fotográfico toda la noche en oscuridad y a - 80 °C.

Extracción de RNA total

Se obtuvieron extractos de RNA total a partir de cerebros de ratones transgénicos TRH-GFP de entre 4 y 5 semanas postnatales. Los cerebros almacenados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ se usaron para disectar varias regiones, entre ellas, bulbo olfatorio, corteza, hipocampo, hipotálamo y cerebelo. Inmediatamente después de remover dichas regiones, el tejido se colocó en hielo seco hasta su procesamiento. El protocolo utilizado para la extracción del RNA total es el reportado previamente (Chomczynski and Sacchi, 1987). En breve, 400 μl de solución desnaturante (sol. D: tiocianato de guanidinio 4 M; citrato de sodio 25 mM pH 7; sarcosyl 5 %; 2-mercaptoetanol 0.1 M) fueron agregados por cada 100 mg de tejido - en adelante todos los pasos se hicieron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, al menos que se indique otra cosa - en tubos de 1.5 ml. El tejido se homogeneizó con ayuda de un homogenizador TRI-R STIR-R (modelo S63C) de velocidad variable. Enseguida, se agregaron 40 μl de acetato de sodio (2 M, pH 4) y 400 μl de fenol (ROCHE) saturado en agua; después de agitar vigorosamente por unos segundos se agregaron 100 μl de la mezcla 24:1 de cloroformo-isoamílico. La mezcla se centrifugó por 17 min a $10,000 \times g$, después de agitar hasta conseguir aspecto lechoso. Se recuperó la fase acuosa de cada tubo y se agregaron 450 μl isopropanol. Las muestras se incubaron por 30 min. en hielo seco y después se centrifugaron como arriba durante 22 min. Se recuperó el sobrenadante de cada muestra y se le agregaron 300 μl de solución D y de isopropanol a cada uno. La mezcla se mantuvo toda la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al día siguiente, las muestras se centrifugaron como se describió, se desechó el sobrenadante y a cada pastilla se le agregaron 400 μl de etanol 70 % para lavar. Se centrifugaron nuevamente, el sobrenadante se retiró y la pastilla de RNA se secó al aire. Cada muestra de RNA se resuspendió en agua con dietil-pirocarbonato (DEPC), para ser cuantificado en

espectrofotómetro a 260 nm y 280 nm; la relación 260/280 se utilizó como indicador de la pureza de las muestras.

RT-PCR

Para sintetizar la cadena complementaria de DNA (cDNA) a partir del RNA total obtenido, 1 µg de RNA total de cada tubo se colocó por separado en un tubo de 0.5 ml y se mezcló con agua DEPC para obtener un volumen final de 12 µl. La mezcla se desnaturalizó a 65 °C durante 5 min; seguido, a cada tubo se le agregaron 20 µl de la mezcla para transcripción reversa (buffer RT: 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂; 0.01 M ditioneitol (DTT); 200 µM dNTP's; 0.5 µg/µl oligo-dT y 100 unidades de transcriptasa reversa (M-MLV-RT 200 U/µl, Invitrogen) y se incubaron por 120 min a 37 °C. Los cDNA's sintetizados se almacenaron a -20 °C hasta su uso ó bien se utilizaron inmediatamente para amplificar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) los genes GFP y ciclofilina.

Los cDNAs se detectaron por PCR utilizando iniciadores específicos que permitieron la amplificación del mRNA de GFP y de ciclofilina. Para GFP se usaron los oligonucleótidos reportados previamente (Magdalena Guerra-Crespo, Tesis doctorado, IBT-UNAM 2004): sentido 5'- CTTGCCTTCGACATCCTGA-3'; antisentido 5'-AGGCC GGTGATGGTCTTCTT-3' producto de 210 pb. Para ciclofilina (CYC), sentido 5'-GGG GAGAAAGGATTTGGCTA-3'; antisentido, 5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC-3', producto de 256 pb (Muller et al., 1998). La reacción de PCR se preparó utilizando 4 ó 6 µl del cDNA para ciclofilina ó GFP respectivamente, y 46 ó 44 µl de mezcla de reacción (buffer de amplificasa (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, (pH 8.3); 1.5 mM MgCl₂); 200 µM dNTPs, 25 pmol de cada oligonucleótido sentido y antisentido, y 5 unidades de DNA-polimerasa (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias). Las condiciones de amplificación para GFP

fueron: 30 ciclos de 1.15 min a 94 °C, 1 min a 60 °C, 2 min a 72 °C, y 10 min a 72 °C de extensión final. Las mismas condiciones se usaron para ciclofilina, excepto que la temperatura de alineamiento fué de 57 °C y la extensión final de 5 min. 20 µl del producto de amplificación se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % y se tiñó con el colorante bromuro de etidio.

Western blot

Se obtuvieron extractos totales de proteína de las regiones ya mencionadas (ver Extracción de RNA) en buffer de lisis (en mM: Tris, 20 (pH 7.4); NaCl, 137; β-glicerofosfato, 25 (pH 7.4); PPINa, 2; EDTA, 2; Tritón X-100, 1%; glicerol, 10%; PMSF, 1; leupeptina, 5 µg/ml; aprotinina, 5 µg/ml; pepstatina, 5 µg/ml; ortovanadato 15 µM; ditiotreititol, 0.5), y se incubaron por 30 min a 4 °C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 10000 x g por 30 min a 4 °C. Se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificaron utilizando el ensayo de Bradford a 594 nm. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

De cada una de las muestras se tomaron 30 µg de proteína total y se llevaron a 20 µl con agua, se adicionó buffer de muestra y se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12 %. Las proteínas se transfirieron a membrana de nitrocelulosa por 1.5 hrs a TA en buffer de transferencia pH 8.3 (39mM glicina, 48mM TRIS base, 0.037% SDS, 20% methanol). Las membranas se bloquearon por 1 hr a TA con solución de bloqueo (BS, 5 % leche descremada en TBS-T (20 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 0.05 % Tween-20), seguido de 3 lavados de 10 min con TBS-T. Las membranas se incubaron toda la noche en agitación a 4 °C con el anticuerpo primario de conejo α-GFP (US Biologicals) 1:200 en TBS-T y fueron posteriormente lavadas 3X en TBS-T a TA. El anticuerpo secundario, cabra α-conejo, acoplado a peroxidasa (Zymed Lab. Inc.) diluido 1:8000 en TBS-T, se incubó con las

membranas por 1.3 hrs a TA en agitación y se lavó 3X en TBS-T como antes. Las proteínas se revelaron utilizando un sistema de quimioluminiscencia (Perkin Elmer) y películas fotográficas Kodak.

Diseño de oligonucleótidos e hibridación in situ (HIS)

Para localizar la expresión endógena del gene de TRH en el cerebro de ratón, se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos sintéticos. Uno complementario a una región del mRNA con la secuencia reportada en la base de datos pública "GenBank" (NCBI, número de acceso NM009426). La secuencia elegida para el oligonucleótido complementario fué: 5'GTCTTCCTCCTTCTCCTCCCTTTTGCCCGGATGCTGGCGTTT TGTGATCC'3, y el oligonucleótido aleatorio que conserva la misma proporción de GCs, utilizado como control negativo fué 5'GCTTATTTCCGCGCCCTGCCTCTTTGTG CCTCGAG TCTTCTGTTGTTCC'3. Ambos oligonucleótidos se diseñaron con ayuda del software Oligo-s (v4.0) y fueron sometidos a búsqueda de complementareidad en la base de datos "NCBI, nucleotide-nucleotide blastn" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para corroborar la especificidad de ambas secuencias. El análisis mostró que el oligonucleótido complementario tenía una identidad de 100 % contra una región del mRNA del gene de TRH de la especie *Mus musculus*, mientras que el oligonucleótido aleatorio no mostró identidad con ninguna secuencia en la base de datos.

Los oligonucleótidos se sintetizaron en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología (UNAM) con el método de fosfito-triéster en un sintetizador automatizado 391 (Applied Biosystems). Posteriormente fueron purificados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y fueron almacenados en congelación (-20 °C) hasta su uso.

El ensayo de HIS se realizó de acuerdo con un protocolo modificado del reportado previamente (Sanchez et al., 1997). Brevemente, secciones coronales de 20 µm de

cerebros de ratones P08 de la cepa CD1, almacenadas en congelación, se secaron con aire caliente y se fijaron por 10 min en 4 % PFA en PBS, después se lavaron 5 min 2X en PBS, seguido de 10 min de acetilación en 4X SSC y posteriormente deshidratación 2 min cada vez, en concentraciones crecientes de etanol: 75 %, 80 %, 95 % y 100 %. Posteriormente se deslipidaron en cloroformo durante 5 min, antes de rehidratar por 2 min en etanol 100 % y 2 min en etanol 95 %.

Los oligonucleótidos se marcaron con (Koller et al.)dATP utilizando 37.5 U/ml de la polimerasa deoxinucleotidil-terminal-transferasa (TDT, Boehringer), con una actividad específica promedio de 8.50×10^8 y 8.65×10^8 cpm/ μ g para el oligonucleótido complementario y aleatorio, respectivamente. Las secciones coronales previamente fijadas se incubaron por 15 horas a 37 °C en atmósfera húmeda en buffer de hibridación (formamida desionizada 50 %, 4X SSC, 100 mM buffer fosfatos, 1 % sarcosil, 1X Denhart, 250 μ g/ml DNA esperma de salmón, 250 μ g/ml tRNA, 50 mM DTT, 250 μ g/ml poly-A y oligonucleótido marcado (1 pmol/ml). Al día siguiente, las secciones se lavaron 2X 30 min en 2X SSC/50 % formamida a 45 °C seguido de 4 lavados de 30 min en 0.2X SSC/0.02 % SDS a 45 °C. Esta concentración de sales ofreció la mejor relación ruido/señal. Posteriormente, las laminillas se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y fueron expuestas a un film fotográfico Biomax (Kodak) por 4 días a TA en oscuridad. Después de este tiempo, el film se reveló durante 2 min en solución reveladora y 2 min en solución fijadora (21.7 % en agua, ambas de Kodak GBX) con un paso intermedio de lavado en agua por 1 min.

Fijación de cerebros para el análisis microscópico

Para realizar la fijación del cerebro, los ratones se perfundieron por inyección cardiaca intraventricular de 50 ml de solución salina (Krebs: NaCl, 0.12 M; KCl, 0.59 M; NaHCO₃, 2.5 mM; NaH₂PO₄, 0.12 mM, CaCl₂, 0.025 mM; MgCl₂, 0.012 mM) glucosilada (0.002 g/ml) y oxigenada por 10 min (95 % O₂/5 % CO₂), seguido de 50 ml de solución al 4 % de paraformaldehído (PFA, en 0.1 M PB (pH 7.4). Los cerebros fueron escindidos del cráneo y sumergidos en PFA al 4 % por 24 hrs más, a 4 °C. Seguido, se equilibraron en una solución al 30 % de sacarosa en 0.1 M PBS. Posterior a este paso, los tejidos fueron sumergidos en solución de corte óptimo (OCT) para crioprotección. Se obtuvieron cortes coronales de 15 μ ó 40 μ de espesor en criostato (OTF, Bright Instruments Co). Las secciones coronales en sentido antero-posterior de 15 μ se colectaron en laminillas de vidrio previamente gelatinizadas (swine skin tipo II (Sigma) mezclada con 0.005 % KCr(SO₄)₂ (Merck), mientras que las secciones de 40 μ se colectaron en flotación con solución PBS (0.1 M; 0.02 % azida de sodio) y se almacenaron a -70 °C ó a 4 °C, respectivamente, hasta su procesamiento.

9. Inmunohistoquímica

Se usaron cortes coronales de cerebros de los ratones transgénicos TRH-GFP de entre 30-35 días postnatales, para inmunotinción de GFP de acuerdo con el protocolo de F. Eckenstein (Universidad de Vermont), (comunicación personal). Brevemente, secciones coronales del cerebro colectadas por flotación en PBS/0.02 % azida de sodio, se incubaron aparte en pozos de 16 mm conteniendo PBS/10% metanol/H₂O₂ 1% durante 15 min a TA en agitación. Inmediatamente se lavaron en PBS durante 10 min. Las secciones se bloquearon por 2 hrs en solución de bloqueo (SB) [10 % suero de caballo ó de feto de bovino (Gibco BRL), 0.5 % tritón X-100 (Sigma), 0.1 % azida de sodio

(Sigma), en TBS] en agitación a TA, antes de ser incubadas con el anticuerpo primario anti-GFP 1:10000 (Clontech), por 18 hrs a 4 °C en agitación. Después de la incubación las secciones se lavaron 2 veces por 15 min en agitación con solución de lavado (SL) (1 % suero de caballo ó de feto bovino, 0.5 % tritón X-100 en TBS) y se incubaron por 2 hrs en agitación y a TA con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-conejo), diluido 1:500 en SB. Las secciones se lavaron por 10 min 3X con SL antes de ser incubadas con una solución del complejo avidina-biotina-HRP (Vector-Labs.) preparado 1 hr antes a TA en agitación por 1 hr. Las secciones se lavaron como antes y se revelaron con una solución de diaminobenzidina (DAB)-cobalto (DAB, 0.5 mg/ml; CoCl₂, 0.2 mg/ml; Urea, 0.3 mg/ml; H₂O₂) (Sigma), ó en una solución de DAB sin cobalto (Sigma), por espacio de 5-10 min. La reacción se detuvo agregando PBS seguido de un lavado con agua milliQ. Posteriormente, las secciones se colocaron en portaobjetos, se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (75, 80, 95 y 100 %), con un paso final de 5 min en xilol y se montaron con Permount (JT-Baker), para ser almacenadas hasta su análisis microscópico.

Microscopía

Durante la primera parte del análisis de a señal de fluorescencia en el SNC de los ratones transgénicos TRH-GFP, las secciones coronales fueron directamente montadas en portaobjetos con una mezcla v/v de PBS y glycerol ("Citi-Fluor"). Las secciones se observaron bajo iluminación de fluorescencia o campo claro en microscopio Nikon (modelo Eclipse E-800). Las imágenes fueron capturadas utilizando una cámara digital (modelo RT-Slider) y el programa "Sopt-Advanced" (Diagnostic Instruments) y editadas posteriormente con el programa Photoshop v. 6 (Adobe).

Para el análisis de las secciones sometidas a inmunotinción, el microscopio utilizado fue el modelo ya mencionado arriba o bien un microscopio de epifluorescencia (Zeiss Axioscope). Las imágenes se procesaron como se describió anteriormente.

RESULTADOS

Análisis del genotipo de los ratones transgénicos

El procedimiento para la generación de la línea transgénica TRH-GFP se puede ver en la sección de materiales y métodos, por lo que la primera parte del análisis consistió en determinar la inserción del transgen en el genoma por "slot-blot". Para ello, se extrajo DNA genómico de una biopsia de la cola de los ratones fundadores y se hibridó con una sonda radioactiva que reconoce a la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento humana (hGH). De un total de 36 ratones analizados, se obtuvieron diez ratones positivos para la inserción (Fig. 7A). Estos ratones "fundadores" fueron puestos a cruzar con ratones de la cepa silvestre C57/BL6 con la finalidad de establecer un pie de cría.

Las señales observadas después de revelar la película demuestran que tanto los ratones fundadores, así como la progenie de éstos, tienen distinto número de copias del transgen insertadas en su genoma, ya que algunos tienen señales muy intensas que se observan con poco tiempo de exposición, mientras que otros no. El genotipo de la progenie se analizó siguiendo la misma técnica de "slot-blot" (Fig. 7B). En la tabla 1 se presenta un resumen de los datos obtenidos de la progenie correspondiente a cada una de las líneas analizadas hasta el momento. De los datos obtenidos, observamos que en promedio los porcentajes de inserción para cada una de las líneas fueron: línea # 9, 57 % de progenie positiva, 43 % negativa; línea # 16, 27 % de progenie positiva y 73 % negativa; línea # 19, 27 % y 73 % de positiva y negativa, respectivamente; línea # 22, 41 % positiva y 59 % negativa; línea # 25, 13 % positiva y 87 % negativa; línea # 29, 87 % positiva y 13 % negativa; línea # 30, 54 % y 46 % de positiva y negativa, respectivamente; línea # 31, 36 % y 64 % de progenie positiva y negativa, respectivamente y por último, la línea # 32, con 36 % y 64 % de positivos y negativos,

respectivamente. Cabe resaltar que la línea # 15 tuvo problemas de apareamiento, ya que no logramos obtener progenie de ella, de tal forma que se llegó a un punto en que el ratón fue demasiado viejo para ser considerado y se descartó por completo del análisis.

Tabla 1. Análisis genotípico de la progenie de las líneas fundadoras del transgen TRH-GFP.

LINEA	TOTAL	INSERCIÓN			
		% M +	% M -	% H+	% H -
9	17	29	29	12	29
16	14	14	29	21	36
19	30	17	37	20	27
22	28	21	25	25	29
25	19	5	37	16	42
29	23	35	13	48	4
30	27	15	30	37	19
31	22	5	41	32	23
32	11	27	45	9	18

La columna **Total**, se refiere al número de crías obtenidas hasta el último lote de colas recibidas para el análisis. %, porcentaje de machos (**M**) o hembras (**H**), positivos (+) o negativos (-) para la inserción del transgen, en función del total de crías. En los recuadros punteados se resaltan las líneas TRH-GFP+ con las que se cuenta actualmente.

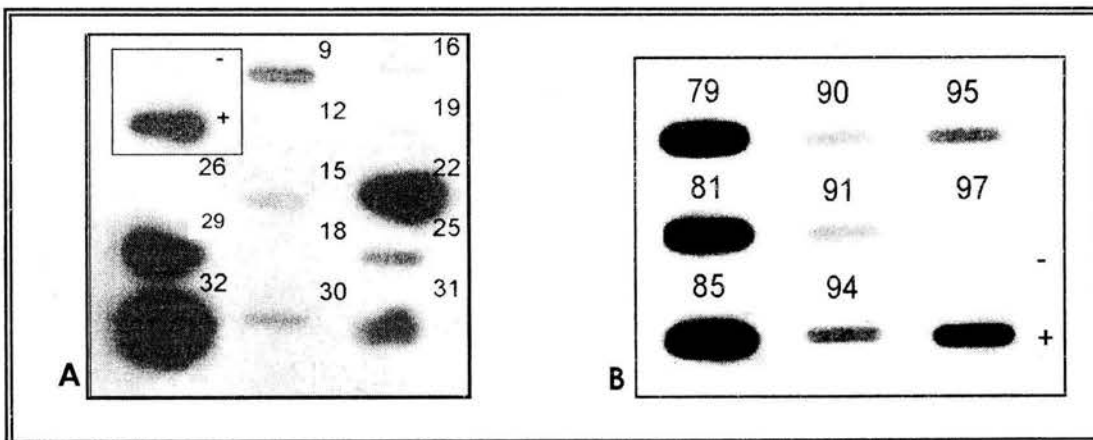


Figura 7. Slot Blot de la señal de poli-A de la hGH. **A)** Fotografía de la película que contiene las señales producto del slot-blot realizado con DNA genómico extraído de colas de ratones fundadores de la línea transgénica TRH-GFP y la sonda de hGH marcada con ^{32}P -dCTP. Diez de las muestras son positivas para la hibridación y se representan con números arbitrarios. **B)** Igual que en A, se utilizaron muestras de DNA de la progenie de los ratones fundadores (79, 81 y 85, línea 32; 90-91, línea 30; 94, 95 y 97, línea 22). Los signos + y - representan el control experimental positivo y negativo, respectivamente.

Análisis de la expresión del mRNA de GFP por RT-PCR

Para demostrar que la inserción del transgene puede llevar a la transcripción del mRNA correspondiente, se realizó un experimento de RT-PCR, utilizando extractos totales de RNA e iniciadores diseñados por Magdalena Guerra durante su trabajo de tesis de doctorado. Del extracto de RNA total se utilizó 1 μ g para sintetizar el cDNA, que posteriormente se utilizó para amplificar GFP y ciclofilina como control endógeno; adicionalmente, como control positivo se utilizó el vector de expresión phr-GFP. Aunque este ensayo es solamente preliminar, permitió observar que la expresión del mRNA de GFP se localiza en las zonas de producción endógena de TRH, como cerebelo, bulbo olfatorio e hipocampo (Fig. 8). Sin embargo, los niveles de expresión no fueron similares en las líneas analizadas (30 y 31), debido probablemente al número de moléculas del mRNA de GFP en cada una.

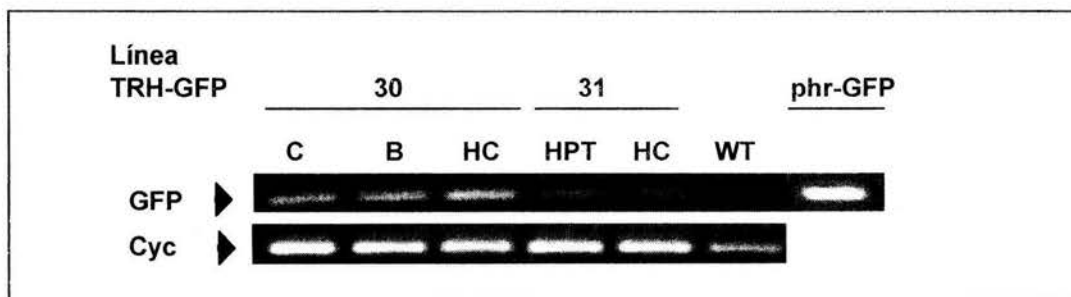


Figura 8. Electroforesis del producto de la RT-PCR para GFP a partir de tejido de distintas regiones cerebrales. Se observan la bandas correspondientes a GFP (producto de 260 pb) y ciclofilina (Cyc, producto de 269 pb). Las regiones analizadas de los las líneas indicadas son: C, cerebelo; B, bulbo olfatorio; HC, hipocampo; HPT, hipotálamo; WT, ratón silvestre (C57BL/6); B-ACT, phr-GFP, vector de expresión de la version no tóxica de GFP.

Estimación de GFP en ratones TRH-GFP por Western blot.

El resultado obtenido en el ensayo de RT-PCR, sugería que algunas regiones cerebrales podían tener niveles diferenciales de expresión del reportero, por lo que surgió el interés por saber si esto se reflejaría a nivel de proteína. Para contestar a esta

pregunta, se corroboró la expresión de la proteína GFP utilizando la metodología de “Western-blot” con extractos totales de proteína obtenidos de las mismas regiones cerebrales de los ratones TRH-GFP de las líneas 30 y 31. El ensayo revelado por quimioluminiscencia, permitió la observación de una banda de aproximadamente 42 KD (Fig. 9) que corresponde a la GFP. Se observó que en las dos líneas independientes el carril que corresponde al bulbo olfatorio no hay banda de GFP. En cerebelo la señal es más intensa en la línea 30 que en la 31, y por el contrario ésta última presenta una banda más intensa en hipocampo respecto de la línea 30. En hipotálamo la señal es débil en la línea 31 y prácticamente ausente en la línea 30 (Fig. 9). Sería interesante poder contrastar este resultado con los niveles del mRNA mediante RT-PCR ya que se podría pensar que habría correlación como es el caso para la línea 31 (ver figura 8, carril 4). Como controles se utilizaron extractos de cerebro de un ratón transgénico que expresa GFP bajo el control del promotor de β -actina y extracto del cerebro de un ratón silvestre.

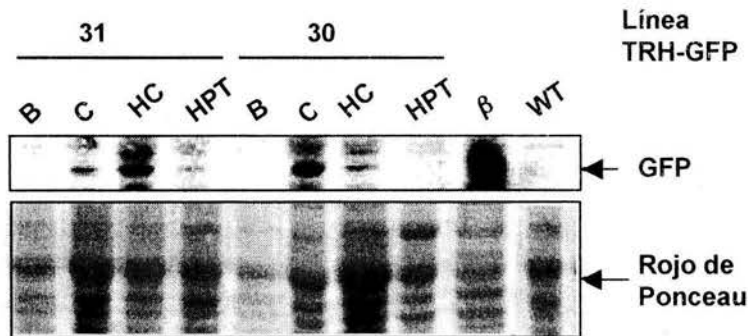
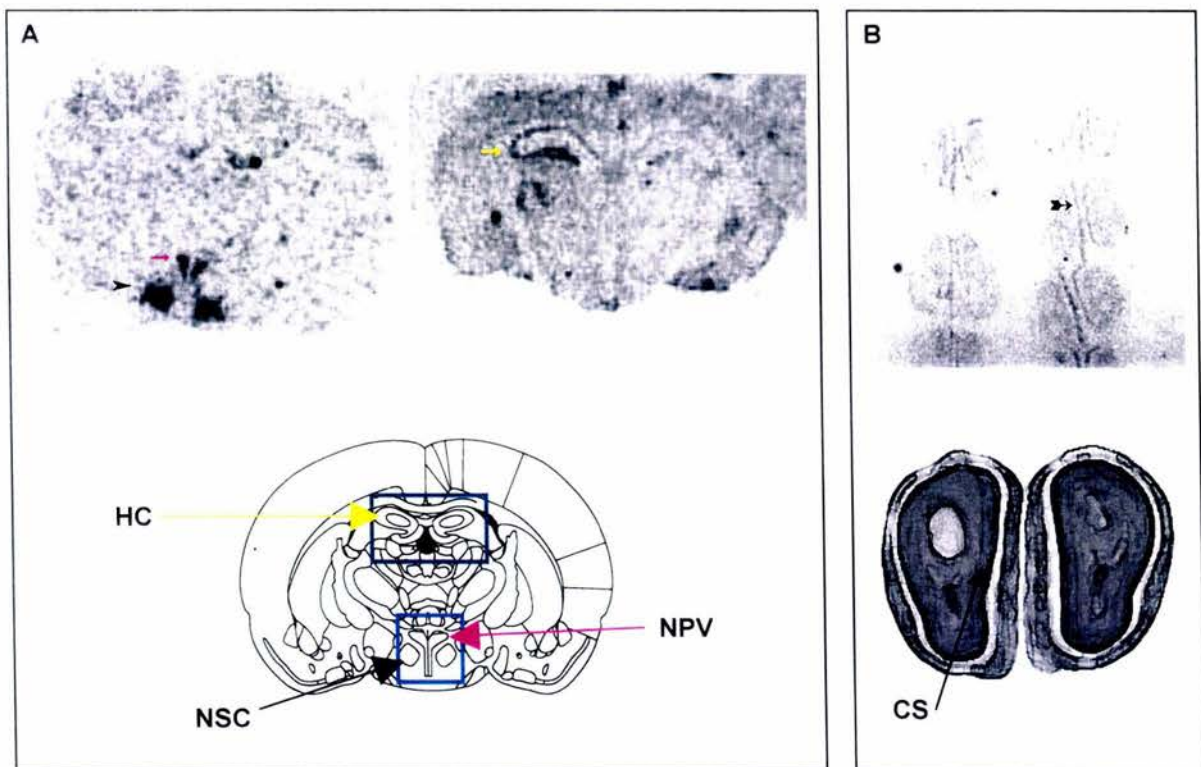


Figura 9. Western Blot de extractos totales de proteína a partir de tejido cerebral. 30 μ g de proteína se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturizantes. Los extractos se obtuvieron a partir de varias regiones del SNC, a saber: **B**, bulbo olfatorio; **C**, cerebelo; **HC**, hipocampo; **HT**, hipotálamo. Como control positivo y negativo se utilizaron extractos totales de ratón β -actina/GFP (β) y de ratón silvestre (**WT**), respectivamente. El control de carga aparece en el panel inferior.

Generación de un mapa de expresión de TRH en el SNC de ratón

Con la finalidad de obtener un mapa de las regiones dentro del sistema nervioso central del ratón que expresan TRH, se realizó la hibridación *in situ* con la sonda complementaria al mRNA de TRH marcada con el isótopo ^{35}S , utilizando el protocolo de hibridación *in situ* (HIS) ya descrito (ver materiales y métodos). Para elaborar este mapa de referencia, se utilizaron secciones coronales adyacentes de 20 μ de espesor de cerebros de ratones silvestres de 5 semanas de edad de la cepa CD1. En la figura 9 se muestran varias fotos representativas de un segmento de la película fotográfica revelada después de 6 días de exposición. Se comprobó que las zonas donde hay señal positiva coinciden con datos generados anteriormente en secciones de cerebros de ratas adultas (Sanchez et al., 2001), (Heuer et al., 2000), (Segerson et al., 1987), siendo el bulbo olfatorio, el hipocampo, núcleo supraquiasmático y el NPV, las regiones identificadas (Fig. 10).



Con la generación de este mapa de expresión, se cuenta con un estándar de comparación que fue usado para contrastarlo con la expresión del gene reportero GFP en las zonas de interés. En este punto, se procedió a hacer el análisis microscópico de la progenie obtenida de los ratones fundadores.

Análisis microscópico de la distribución de la GFP en el cerebro de los ratones positivos para la inserción.

Para llevar a cabo esta fase del análisis, periódicamente se recibieron lotes de animales de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensayo de "southern-blot". Se utilizaron aquellos animales cuya señal de hibridación fuese por lo menos igual o mayor en relación al control positivo. Además, algunos ratones negativos para la inserción se usaron como controles internos negativos.

Se obtuvieron secciones coronales de los cerebros de tal forma que se representaba la mayoría del eje antero-posterior. De las secciones analizadas en microscopía de fluorescencia, observamos que las correspondientes a la línea 30 presentan un patrón de fluorescencia en regiones cerebrales (Fig. 11) que coincidió con el patrón de la señal obtenida en el ensayo por HIS para el mRNA de TRH (ver Fig. 10). Este resultado sugiere que obtuvimos una línea positiva tanto para la inserción como para la expresión tejido-específica del transgen.

El análisis subsecuente del resto de los animales por el mismo método mostró que la mayoría de los animales eran negativos para la expresión de GFP. Se observó que en la mayoría de las secciones coronales el ruido de fondo, es decir la señal de autofluorescencia era reproducible. Esto nos llevó a pensar que posiblemente nuestro

← **Figura 10.** Hibridación *in situ* del mRNA de TRH en secciones coronales de cerebros de ratones postnatales de 35 días. Se muestran las imágenes representativas de la señal de hibridación observada en la película fotográfica. En el panel **A** se aprecia la señal en los núcleos paraventricular (**NPV**) (→), supraquiasmático (**NSC**) (►); e hipocampo (**HC**) (↔). En el panel **B** aparece la señal alrededor de la corteza singularada (**CS**) en el bulbo olfatorio (↗). Las referencias de posición de las regiones mostradas según el atlas de (Paxinos, 1986), y el de (Sidman), se muestran en cada caso.

método de perfusión era inadecuado para observar la señal de GFP de forma directa en el tejido. Por lo que se optó por utilizar protocolos alternativos de fijación del tejido. Aquí, decidimos usar distintos fijadores como: formaldehído (FA), paraformaldehído (PFA), FA y/o PFA seguido de incubación en solución de sacarosa al 30 %; solución Bouins (0.9 % ácido pícrico, 1 % PFA, 5 % ácido acético) sólo o seguida de la incubación con la solución de sacarosa mencionada, entre otros. El control positivo fue tejido del ratón β -actina/GFP y como control negativo tejido de un ratón silvestre. Los tejidos fijados se seccionaron como antes y el análisis microscópico mostró que el método de fijación que ofrecía la mejor relación ruido/señal, era aquel utilizando PFA, sacarosa 30 % y crioprotección con OCT (datos no mostrados).

Se procedió entonces a revisar la expresión del resto de la progenie utilizando este método de fijación y corroborar si en efecto, estaríamos en posibilidad de discriminar la señal auténtica del ruido de fondo. Sin embargo, aún con este proceso el análisis microscópico no mostró a ninguna otra línea positiva para la expresión de GFP (datos no mostrados). Quedaba la posibilidad de que la expresión de GFP fuera insuficiente para una detección eficiente de la fluorescencia residual.

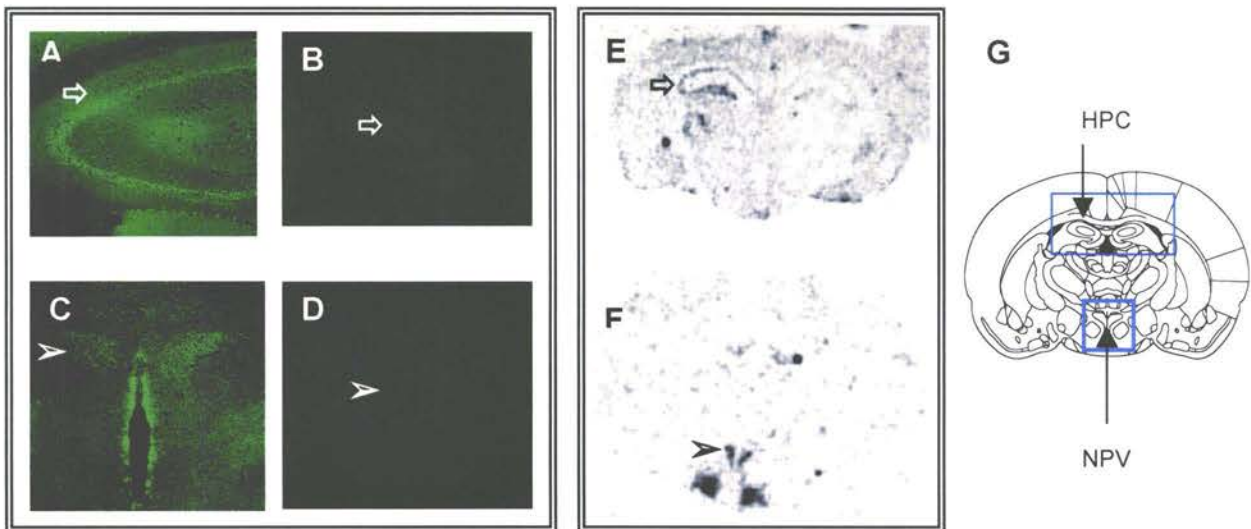


Figura 11. Microfotografías de secciones coronales del cerebro de un ratón de la línea # 30 (fundador). Las secciones se analizaron bajo microscopía de fluorescencia. Se observa la señal en la zona correspondiente al hipocampo (\Rightarrow), y al NPV hipotalámico (\succ) en el ratón TRH-GFP (A y C), y en el silvestre (B y D). Se presentan las señales correspondientes a la HIS de TRH en hipocampo (E) y NPV (F) en las secciones de ratones silvestres. En G se observa la localización anatómica de dichas regiones. Ampliación original A-C, 10X; D, 5X.

Como una alternativa para sobrepasar estos inconvenientes, se pensó en la utilización de técnicas indirectas de detección de la señal, como la inmunotinción con anticuerpos dirigidos contra la GFP.

Utilizando la metodología optimizada por el Dr. F. Eckenstein (Universidad de Vermont), se logró identificar que otras dos líneas positivas para la inserción, la # 29 y # 31, también lo eran para la expresión del gene reportero (Fig. 12 y 13). El resto de los cerebros de la progenie analizada hasta el momento resultó, desde un nivel únicamente microscópico de análisis, negativo en cuanto a una señal específica (no mostrado).

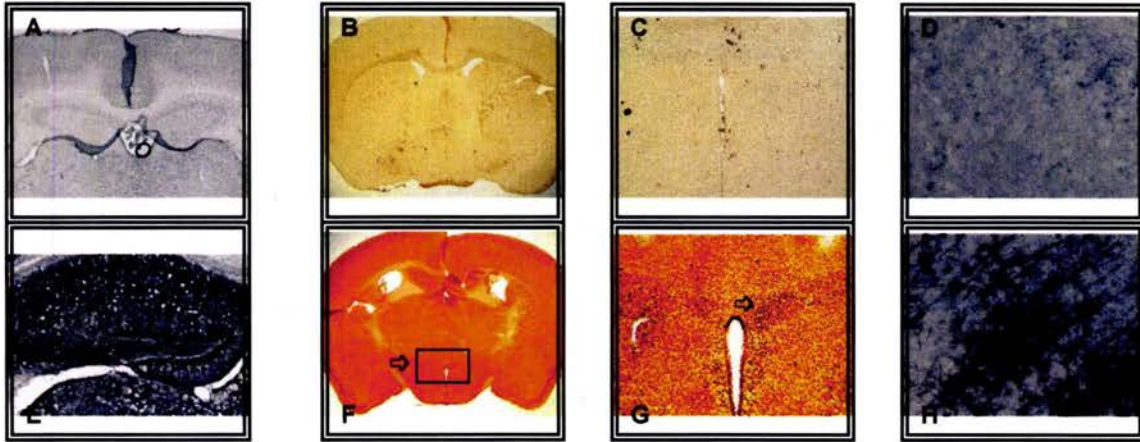


Figura 12. Inmunohistoquímica de GFP en secciones coronales del cerebro del ratón 115, que deriva de la línea fundadora # 29. En el panel inferior se observa la señal obtenida después de revelar con peroxidasa en la region del hipocampo (E) y NPV hipotalámico (F y G, \Rightarrow). En el panel superior se muestran los controles (A-C) correspondientes, sin anticuerpo primario. Aparece también la señal en dos secciones del ratón transgénico usado como control positivo con (H) y sin (D) anticuerpo primario. Ampliación original A y E, 10X; B y F, 2X; C y G, 5X; D y H, 20X.

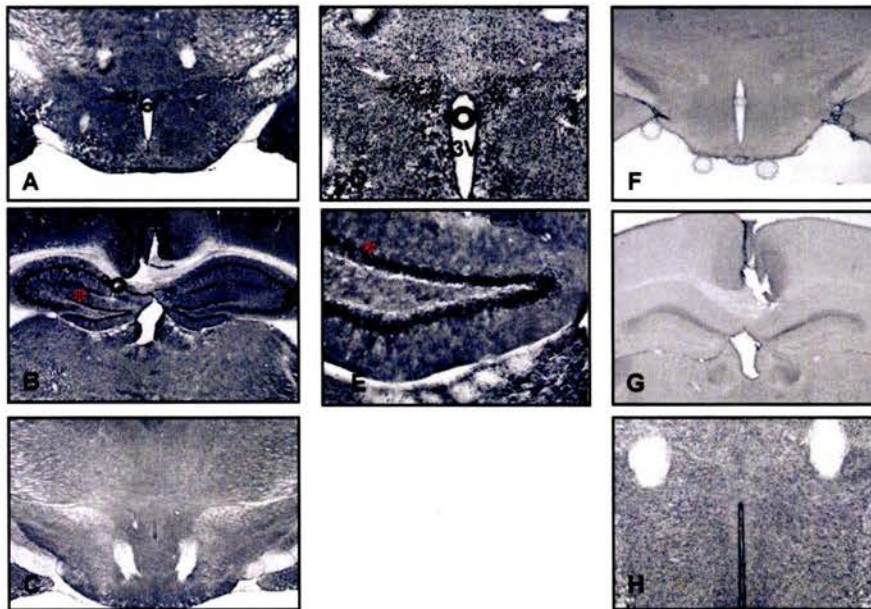


Figura 13. Inmunohistoquímica de GFP en secciones coronales de cerebros de ratones P35. Microfotografías representativas que indican las señales observadas en un ratón de la línea TRH-GFP # 30 (A, B, D-G) y silvestre (C y H), en el NPV (flechas en A y D) así como en hipocampo (* en B y E). Se muestra el control silvestre con (C) y sin (F- H) anticuerpo primario; tercer ventrículo (3V). Ampliación original: A, C y F 5X; B, D, G y H, 10X; E 20X.

Los datos obtenidos hasta este momento permiten decir que tenemos tres líneas positivas para la inserción y la expresión del gene reportero GFP en el SNC. La mayor parte de los datos que apoyan esta conclusión se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de los datos obtenidos después del análisis realizado a la progenie de tres líneas positivas de ratones transgénicos.

Línea # TRH-GFP	Región Cerebral	Análisis de la expresión de GFP			
		RT-PCR	Western-Blot	Inmunohistoquímica	Fluorescencia
29	B	ND	ND	ND	X
	HPT	ND	ND	✓	X
	HC	ND	ND	✓	X
	C	ND	ND	ND	X
30	B	✓	X	✓	ND
	HPT	ND	✓	✓	✓
	HC	✓	✓	✓	✓
	C	✓	✓	ND	✓
31	B	ND	X	ND	ND
	HPT	✓	✓	ND	ND
	HC	✓	✓	ND	ND
	C	ND	✓	ND	ND

ND, aún no determinado; ✓, indica resultado positivo; X indica resultado negativo. B, bulbo olfatorio; HPT, hipotálamo; HC, hipocampo; C, cerebelo.

DISCUSION

El BDNF y su papel en el desarrollo del fenotipo TRHérgico

Las neurotrofinas han sido involucradas en múltiples procesos celulares, como la plasticidad sináptica, la sobrevivencia, la muerte de tipo apoptótico y el aspecto morfológico, entre muchos otros (revisado en: (Tapia-Arancibia et al., 2004), (McAllister et al., 1999), (Patterson and Nawa, 1993). La mayoría de estos efectos celulares son mediados por la unión de alta afinidad a receptores de tipo tirosina-cinasa (trk). Así, trk-A une a NGF, mientras que BDNF y NT-3 se unen a trk-B y trk-C, respectivamente; las neurotrofinas pueden además unirse con menor afinidad al receptor de la familia de necrosis tumoral (TNF), p75^{NTR} (McAllister et al., 1999), (Chao, 1992).

Las neuronas hipotalámicas son un grupo de células que tienen gran importancia desde el punto de vista homeostático, ya que regulan algunos eventos hormonales a través de la síntesis y posterior liberación hacia la hipófisis de péptidos con actividad hormonal (Burbach et al., 2001). Algunos de los efectos de las neurotrofinas sobre la fisiología de los fenotipos peptidérgicos hipotalámicos incluyen los obtenidos por nuestro laboratorio. Por ejemplo, en parte de este estudio, se intentó dilucidar el impacto del BDNF sobre las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas neonatales. Encontramos que la magnitud del incremento en el mRNA de TRH observada en el cultivo estimulado por 4 días *in vitro* (DIV) con BDNF en las neuronas hipotalámicas neonatales es similar al observado previamente en etapas embrionarias de desarrollo (Guerra-Crespo et al., 2001). Sin embargo, esta respuesta no se mantiene en el tiempo cuando se analiza la cinética de la respuesta al estímulo parcial, ya que después de retirado el estímulo observamos una reversión en el nivel del mRNA de TRH, que llega a niveles similares al control al día 10 de cultivo. Un efecto similar fue observado por otros autores en cultivos de neuronas corticales fetales, en donde el estímulo con BDNF durante 8 días incrementa la expresión de SS y NPY al tercer día de cultivo, mientras que el estímulo parcial de 5

días y monitoreado al octavo día mostró un reversión de dicho incremento (Nawa et al., 1993). Estos datos en conjunto, plantean la posibilidad de que las neuronas peptidérgicas requieren de la presencia constante del estímulo neurotrófico para mantener activa la biosíntesis del péptido en cuestión. Por lo tanto, es probable que las neurotrofinas ejerzan un efecto regulador sobre el fenotipo peptidérgico. Sin embargo, puesto que nuestro sistema modelo es mixto (existen múltiples fenotipos celulares), una explicación alternativa para el descenso en la magnitud de la respuesta sobre el mRNA inducida por BDNF una vez retirado el estímulo, es que en respuesta al BDNF otras células neuronales como aquellas de CRH ó VP, liberasen reguladores negativos para la expresión de TRH. Algunos efectores de dicha regulación han sido identificados, por ejemplo, neurotransmisores que inhiben la expresión de TRH en cultivos hipotalámicos fetales, como el ácido gama-aminobutírico (GABA) (Fekete et al., 2002).

El efecto observado con el estímulo limitado en tiempo de BDNF en el cultivo hipotalámico neonatal nos planteó la interrogante sobre el efecto que la neurotrofina ejercería en caso de mantenerla presente en el sistema durante los 12 DIV. Observamos que el estímulo con BDNF mantenido por 12 días consecutivos, desensibiliza la respuesta del sistema. El incremento del mRNA de TRH de los primeros 6 DIV, se reduce significativamente a los 8 DIV. Existen diversas explicaciones para este resultado. Por ejemplo, la participación del receptor $p75^{NTR}$. Se sabe que las neurotrofinas pueden regular eventos de muerte celular a través de la participación de este receptor (Hempstead, 2002). Así, el mecanismo de muerte se inicia cuando hay ausencia de los receptores tipo trk y las neurotrofinas se unen principalmente a $p75^{NTR}$, activando vías pro-apoptóticas como la de cinasa Jun (Jnk) (Huang and Reichardt, 2003). En este punto es importante mencionar que, si bien las variables funcionales (muerte celular, expresión de marcadores neurales, corriente eléctrica, etc.) de las células en el cultivo no fueron analizadas con detalle, creemos que esta disminución no

se debe a la muerte celular porque los niveles totales de RNA se mantuvieron relativamente constantes a lo largo del experimento, lo que nos hace pensar que el número de células viables no tuvo variaciones significativas. Con las consideraciones pertinentes, esto es consistente con los datos que muestran que el BDNF no afecta el número de células TRHérgicas mantenidas por 4DIV en presencia de BDNF (Guerra-Crespo et al., 2001).

Por otro lado, se ha visto que la exposición prolongada a BDNF de neuronas corticales embrionarias o neuronas granulares cerebelares de 6 días postnatales, regula negativamente la expresión de *trk-B* a nivel de proteína, mecanismo en el que participa activamente el complejo proteasoma de degradación (Sommerfeld et al., 2000), (Knusel et al., 1997). Sin embargo, datos previos de M. Guerra sugieren que esto no opera en nuestras condiciones, ya que el BDNF, incrementa significativamente la expresión del receptor al 4DIV, pero queda pendiente la cuantificación de los niveles de *trk-B* en nuestros ensayos para determinarlo.

La participación de las isoformas truncadas del receptor *trk-B* en nuestro modelo *in vitro* también debe considerarse. En el SNC se han identificado dos isoformas truncadas para el *trk-B* (Kryl et al., 1999), (Baxter et al., 1997), (Armanini et al., 1995). Dichas isoformas no catalíticas del receptor carecen del dominio intracelular de cinasa y su expresión está sujeta a regulación durante el desarrollo (Ninkina et al., 1996). Hay evidencias de que las isoformas truncadas de *trk-B* pueden regular la disponibilidad de BDNF tanto *in vivo* como *in vitro* (Biffo et al., 1995), (Baxter et al., 1997), y de que son capaces de activar vías de transducción a través de su dominio intracelular posiblemente activando proteína-cinasas (PKs) (Armanini et al., 1995); (Baxter et al., 1997). Datos adicionales muestran que las neuronas granulares de cerebelo postnatal de 6 días al ser estimuladas con BDNF, regulan negativamente la expresión de *trk-B* catalítico pero no las isoformas truncadas (Sommerfeld et al., 2000). Estos datos

sugieren dos posibles escenarios. El primero es que, en caso de existir en nuestro sistema, las isoformas truncadas pudiesen modular la disponibilidad de la neurotrofina exógena; y por otro, que exista una regulación negativa de la expresión de receptor en respuesta a la unión con su ligando. La captura del BDNF por las isoformas truncadas podrían activar vías metabólicas distintas de las que se observan con la isoforma catalítica (Huang and Reichardt, 2003).

Adicionalmente, la ausencia de los blancos naturales (células de la eminencia media) de las neuronas TRHérgicas *in vitro*, puede ser otro factor relevante en el sistema. La muerte por apóptosis ha sido documentada en un modelo de células de corteza que carecen del soporte trófico cuando se aíslan *in vitro*; en este modelo, la adición de medio condicionado o de factores tróficos específicos (NT-3, IGF-1, GDNF, PDGF) sólo o en combinación, al cultivo de células corticales, revierte la muerte significativamente, manifestando la necesidad de este soporte *in vitro* (Catapano et al., 2001). En ese contexto, es posible que las células hipotalámicas aisladas y mantenidas *in vitro* por periodos prolongados requieran de la presencia de ciertos factores para ser metabólicamente funcionales y/o viables. De acuerdo con los datos que se tienen sobre la ontogenia de la expresión de los trks en el SNC (Ringstedt et al., 1993), se puede pensar que tal dependencia podría existir en nuestro sistema, es decir, que no sólo se requiera de BDNF para observar un aumento del mRNA de TRH, sino que además éstas neuronas sean dependientes de NT-3 o NGF en etapas específicas de diferenciación terminal para ser activadas, independientemente de los estímulos neurales mediados por neurotransmisores.

Por último, pensamos que el BDNF endógeno presente en el cultivo, como resultado de la actividad celular de varios de los fenotipos celulares, pudiera tener un papel relevante para explicar la desensibilización. Las concentraciones de los transcritos de NT-3 y BDNF *in vitro* en *in vivo* varían de acuerdo con la región hipotalámica (Petit et al., 2002),

(Marmigere et al., 2001), (Nawa et al., 1995). A diferencia de las concentraciones relativamente bajas halladas *in vitro*, las concentraciones *in vivo* de ambas neurotrofinas son siempre mayores. Sin embargo, aún en condiciones de baja expresión y maduración del BDNF endógeno en cultivo hipotalámico fetal (Guerra-Crespo et al., 2001), es posible que éste sea suficiente para saturar los receptores, de tal manera que la adición de BDNF exógeno pierda efectividad al final del cultivo.

Si bien la exposición continua de las neuronas en cultivo a la neurotrofina produce una desensibilización de la respuesta, un inconveniente para tratar de extrapolar este comportamiento a las neuronas *in vivo*, es que *in vivo* las neuronas pueden no estar expuestas a la neurotrofina en forma continua sino periódica, por lo que la respuesta que observamos *in vitro* pudiera no reflejar lo que pasa *in vivo*. Se hace necesario entonces el análisis de la respuesta en cultivos de edades posteriores, por ejemplo de hipotálamos P7 ó P10 sometidos a paradigmas similares para determinar si neuronas con edades más avanzadas dejan de responder al BDNF. Los datos son consistentes sin embargo, con el hecho de que en ratones mutantes homocigotos que no expresan BDNF en la edad adulta, (pero que sí lo expresan en la edad neonatal) (BDNF^{-/-}), los niveles de expresión de TRH hipotalámico no varían respecto de los silvestres, evidenciando que su ventana de acción sobre el fenotipo TRHérgico es limitada (Rios et al., 2001).

Estos resultados en conjunto muestran, en primer lugar, que las neuronas hipotalámicas neonatales mantenidas *in vitro* libres de suero, mantienen su capacidad de respuesta al estímulo con la neurotrofina BDNF, lo cual se extiende a lo observado utilizando neuronas de embriones de 17 días de gestación (Guerra-Crespo et al., 2001). En segundo lugar, que el incremento del mRNA de TRH es reversible y desensibilizado a exposiciones prolongadas. Esto sugiere que existe un período determinado de

responsividad en el cual las neuronas TRHérgicas hipotalámicas responden a dicha neurotrofina.

En cuanto a la respuesta observada en los ensayos en los que se estimuló a neuronas del NPV, esperábamos que si estas neuronas TRHérgicas responden al BDNF, la respuesta al estímulo con BDNF en el cultivo fuese mayor que la correspondiente al hipotálamo completo en las mismas condiciones. Los datos sugieren fuertemente que las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV son las principales responsables de dicha respuesta en el cultivo hipotalámico total. Esta interpretación es consistente con los antecedentes del laboratorio que muestran que en el NPV adulto, la mayoría de las neuronas TRHérgicas expresan el *trk-B* catalítico (Uribe et al., datos no publicados). Por lo tanto sugerimos que las respuestas observadas en cultivos hipotalámicos provienen principalmente de esta población. Así, la hipótesis que proviene del conjunto de los datos es que existe un período crítico durante el cual el BDNF contribuye a la inducción de la expresión del mRNA de TRH en el NPV, mientras que otros núcleos hipotalámicos son insensibles a su efecto.

Efecto de la región que va de -776 a +84 pb en la regulación de la expresión de GFP en el SNC de los ratones transgénicos TRH-GFP.

Ciertos tipos de neuronas del SNC son difíciles de estudiar debido a que no se pueden identificar por su posición o criterios morfológicos solamente. Una manera de identificar a tales neuronas es etiquetarlas con una proteína reportera. Una proteína reportera es aquella cuya expresión está ligada a un gene de interés y que puede observarse por efecto de su luminiscencia, fluorescencia, etc. (Spergel et al., 1999).

El trabajo realizado por Balkan y colaboradores utilizando el reportero luciferasa para etiquetar a las neuronas TRHérgicas, es la primera estrategia de este tipo para tratar de

identificar las secuencias regulatorias que confieren la tejido-especificidad del gene de TRH (Balkan et al., 1998). Sin embargo, la estrategia de estos autores presenta dos inconvenientes importantes, 1) el hecho de tener que obtener bloques de tejido para homogeneizar y posteriormente medir la actividad de la enzima limita la capacidad para identificar la expresión célula-específica del reportero; 2) la estrategia de valoración de la actividad del reportero se restringe solamente a la actividad *in vitro* de la enzima. No obstante estos inconvenientes, los autores concluyen que la región del primer exón que comprende los primeros 84 pb, le confiere tejido-especificidad a la expresión del reportero.

Con base en estos resultados, en nuestro grupo se aprovechó el vector generado por estos autores para llevar a cabo un estudio utilizando el protocolo optimizado de cultivo primario de neuronas hipotalámicas embrionarias (Joseph-Bravo et al., 2002), las cuales al ser transformadas con el vector pQBI25-TRH, permitieron comprobar que, efectivamente, sólo las neuronas hipotalámicas de fenotipo TRHérgico expresan el reportero (Guerra-Crespo et al., 2003).

La segunda parte de este trabajo se involucró con la primera fase de una estrategia surgida a partir de tales resultados. Decidimos determinar si la secuencia promotora ya descrita, era capaz de conferir la expresión célula-específica *in vivo* de la GFP en el SNC de ratones. Utilizando el fragmento TRH-GFP/hGH (ver materiales y métodos) se generaron 10 líneas transgénicas independientes denominadas TRH-GFP. Cada una de estas líneas presentó características corporales y de comportamiento indistintas de aquellas mostradas por sus similares silvestres (datos no mostrados). Sin embargo, una de ellas, la # 15, tuvo dificultades para el apareamiento, ya que no se obtuvo progenie de ella aún estando el macho silvestre por varios días en la misma caja que la hembra transgénica. Las posibles explicaciones para este evento son que la inserción del

transgene interfiera con la regulación del ciclo estral, o bien que la hembra presentara un comportamiento indiferente o agresivo hacia la presencia del macho (no observado). El análisis microscópico realizado para observar la expresión del gene reportero nos permitió detectar dos líneas que fueron positivas para la expresión de GFP en las zonas del SNC donde existe expresión endógena de TRH. Una tercera línea se identificó de manera indirecta gracias a la técnica de RT-PCR y "Western-blot". No obstante que se tenían 6 líneas más y que la comprobación genotípica fue positiva, el análisis microscópico de secciones coronales del cerebro de la progenie, mostró que algunas eran negativas para la expresión del reportero, hecho que se corroboró por inmunotinción contra GFP. Es posible que los ratones positivos para la inserción pero negativos para la expresión sean consecuencia de que el sitio de inserción del transgen impida la actividad transcripcional. Este mecanismo de silenciamiento se ha reportado en la literatura, e indica que ciertas zonas de la cromatina, específicamente la heterocromatina, pueden contener histonas altamente acetiladas, lo que compacta las zonas de marcos de lectura, impidiendo la entrada de la maquinaria transcripcional (Hoyos et al., 2005).

Los datos con las tres líneas GFP positivas nos mostraron que existen diferencias entre ellas en cuanto a la expresión de la GFP. Especialmente, llama la atención el hecho de que la línea # 30, presenta niveles similares de expresión del mRNA de GFP en cerebelo, bulbo olfatorio e hipocampo (ver figura 8, carriles 1, 2 y 3, respectivamente), mientras que la proteína está prácticamente ausente en la región que corresponde al bulbo olfatorio (figura 9). En contraste, observamos que hay expresión de la proteína en cerebelo e hipocampo, aunque en este último la expresión es menor con respecto al primero. Una situación similar ocurre con la expresión de la proteína en la línea # 31, pero a diferencia de la línea # 30, la expresión del mRNA de GFP en las regiones correspondientes es menor (figura 8, carriles 4 y 5), lo cual no se refleja en los niveles

de proteína (ver figura 9). En este caso observamos que el hipocampo presenta el mayor nivel de expresión, mientras que el hipotálamo y el bulbo olfatorio por el contrario, tienen escasos niveles de proteína, siendo el cerebelo un punto intermedio entre el hipocampo y el resto de las regiones analizadas. Desafortunadamente no se cuenta con los datos sobre la expresión del mRNA de GFP en el cerebelo y bulbo olfatorio de este último ratón, lo cual hubiese permitido contrastar los datos con sus niveles correspondientes de proteína.

Podemos decir hasta este momento, que los niveles de expresión del mRNA no son necesariamente un indicador de la presencia de la proteína GFP en nuestro modelo, lo que explicaría algunos de los resultados obtenidos por inmunohistoquímica o detección de fluorescencia directa en el tejido. Es posible que la actividad traduccional disminuyó debido a la presencia de secuencias nucleotídicas tipo AUUUA --y las secuencias aledañas a éstas-- en la región 3' no traducida del mRNA del transgene. Se ha demostrado que regiones específicas conteniendo secuencias del tipo mencionado, ya sea de forma individual o de manera cooperativa, desestabilizan los transcritos de diversos genes, entre ellos el de la interleucina 10 (IL-10) y el de VEGF (Powell et al., 2000), (Liu et al., 2002). La carencia de una señal intensa de GFP en la región hipotalámica de interés, puede significar que la tasa de degradación de la proteína GFP es mayor que el promedio observado para otras proteínas endógenas; sin embargo, la competencia entre el alelo silvestre y el transgene por la maquinaria transcripcional podría ser una de las principales causas de que observemos una señal débil de fluorescencia.

El trabajo de comprobación de la expresión del reportero a nivel celular y tisular todavía está en fase experimental; creemos que una vez que se tengan los animales físicamente en el bioterio de nuestro Instituto, estaremos en posibilidad de rastrear la

expresión *in vivo* de los mRNAs de TRH y de GFP mediante un ensayo de hibridación *in situ* doble, en cortes coronales de cerebros de nuestros ratones transgénicos.

CONCLUSIONES

PARTE I

- a) Las neuronas hipotalámicas neonatales son responsivas al estímulo con BDNF.
- b) El mantenimiento del estímulo con BDNF durante cuatro días revierte el incremento del mRNA de TRH en las neuronas hipotalámicas neonatales.
- c) Las neuronas TRHérgicas neonatales se desensibilizan cuando son expuestas de forma continua al estímulo con BDNF.
- d) Las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del núcleo paraventricular son las principales responsables del incremento del mRNA de TRH en respuesta al estímulo con BDNF.

PARTE II

- a) Se obtuvieron tres líneas independientes para la inserción del transgene TRH-GFP.
- b) La expresión de GFP en el SNC de las líneas # 29 y 30 recapitula la expresión endógena del gen de TRH de ratones silvestres.

PERSPECTIVAS

En cuanto al efecto del BDNF, un aspecto crucial que falta por definir es si la eliminación *in vivo* o *in vitro* del BDNF (o *trk-B*) es capaz de reducir los niveles del mRNA de TRH en el NPV fetal o neonatal.

En cuanto a la caracterización de los ratones TRH-GFP, estamos aún en la etapa de análisis de los cerebros de cada una de las líneas obtenidas y hasta este momento tenemos 3 líneas que expresan GFP en el NPV hipotalámico.

Esperamos realizar ensayos posteriores para colocalizar la señal de GFP con el mRNA de TRH para confirmar la identidad neuronal de las células que sean positivas para la expresión de la GFP. Para ello se prevé realizar un ensayo de HIS e inmunohistoquímica con secciones coronales de cada línea positiva, o bien una hibridación doble para el mRNA de TRH y de GFP.

Además de estos datos básicos en el proceso de caracterización de la línea de ratones, creemos que a mediano plazo, estos ratones serían de utilidad en la obtención de datos fisiológicos o a nivel molecular, pues ofrecen la ventaja de poder aislar células TRH+ de las regiones de producción endógena del péptido.

REFERENCIAS

1. Acampora, D., Postiglione, M. P., Avantaggiato, V., Di Bonito, M., Vaccarino, F. M., Michaud, J., and Simeone, A. (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the *Orthopedia* gene. *Genes Dev* 13, 2787-2800.
2. Akil, H., Campeau, S., Cullintan, E.W., Lechan, R.M., Toni, R., Watson, S.J. and More, R.Y. (1999). Neuroendocrine systems I: Overview Thyroid and adrenal axes. In *Fundamental Neuroscience*, M. J. Zigmond, Bloom, F. E., Landis, S. C., Roberts, J. L., Squire, L. R., ed. (San Diego, Academic Press), pp. 1128-1131.
3. Armanini, M. P., McMahon, S. B., Sutherland, J., Shelton, D. L., and Phillips, H. S. (1995). Truncated and catalytic isoforms of *trkB* are co-expressed in neurons of rat and mouse CNS. *Eur J Neurosci* 7, 1403-1409.
4. Armstrong, W. E. (1985). Hypothalamic, supraoptic and paraventricular nuclei. In *The Rat Nervous System*, G. Paxinos, ed. (Sydney), pp. 119-1128.
5. Balkan, W., Tavianini, M. A., Gkonos, P. J., and Roos, B. A. (1998). Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology* 139, 252-259.
6. Baxter, G. T., Radeke, M. J., Kuo, R. C., Makrides, V., Hinkle, B., Hoang, R., Medina-Selby, A., Coit, D., Valenzuela, P., and Feinstein, S. C. (1997). Signal transduction mediated by the truncated *trkB* receptor isoforms, *trkB.T1* and *trkB.T2*. *J Neurosci* 17, 2683-2690.
7. Biffo, S., Offenhauser, N., Carter, B. D., and Barde, Y. A. (1995). Selective binding and internalisation by truncated receptors restrict the availability of BDNF during development. *Development* 121, 2461-2470.
8. Brasier, A. R., Tate, J. E., and Habener, J. F. (1989). Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines. *Biotechniques* 7, 1116-1122.
9. Brewer, G. J. (1997). Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J Neurosci Methods* 71, 143-155.
10. Burbach, J. P. (2000). Genetic pathways in the developmental specification of hypothalamic neuropeptide and midbrain catecholamine systems. *Eur J Pharmacol* 405, 55-62.
11. Burbach, J. P., Luckman, S. M., Murphy, D., and Gainer, H. (2001). Gene regulation in the magnocellular hypothalamo-neurohypophysial system. *Physiol Rev* 81, 1197-1267.
12. Card, J. P., Swanson, L. W., Moore, R. Y., (1999). The hypothalamus: an overview of regulatory systems. En: *Fundamental Neuroscience* (San Diego, Academic Press).
13. Catapano, L. A., Arnold, M. W., Perez, F. A., and Macklis, J. D. (2001). Specific neurotrophic factors support the survival of cortical projection neurons at distinct stages of development. *J Neurosci* 21, 8863-8872.
14. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., and Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
15. Chao, M. V. (1992). Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* 9, 583-593.
16. Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
17. Chow, C. W., Rincon, M., and Davis, R. J. (1999). Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol Cell Biol* 19, 2300-2307.
18. Cote-Velez, A., Pérez-Martínez, L., Díaz-Gallardo, M. Y., Pérez-Monter, C., Carreón-Rodríguez, A., Charli, J. L., and Joseph-Bravo, P. (2005). Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *J Mol Endocrinol* 34, 177-197.
19. Cronin, A. S., Horan, T. L., Spergel, D. J., Brooks, A. N., Hastings, M. H., and Ebling, F. J. (2004). Neurotrophic effects of BDNF on embryonic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons. *Eur J Neurosci* 20, 338-344.

20. De Kloet, E. R. (2004). Hormones and the stressed brain. *Ann N Y Acad Sci* 1018, 1-15.
21. de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7, 725-737.
22. Dostert, A., and Heinzl, T. (2004). Negative glucocorticoid receptor response elements and their role in glucocorticoid action. *Curr Pharm Des* 10, 2807-2816.
23. Fekete, C., Wittmann, G., Liposits, Z., and Lechan, R. M. (2002). GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res* 957, 251-258.
24. Fink, G., Dow, R. C., Casley, D., Johnston, C. I., Bennie, J., Carroll, S., and Dick, H. (1992). Atrial natriuretic peptide is involved in the ACTH response to stress and glucocorticoid negative feedback in the rat. *J Endocrinol* 135, 37-43.
25. García-Vázquez A. (2002). Optimización de la microdissección del núcleo paraventricular hipotalámico de rata en etapa neonatal. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
26. Griffiths, E. C. B., G.W. (1983). Thyrotropin-releasing hormone: An Introduction. In *Thyrotropin-releasing hormone*, E. B. Griffiths, GW, ed. (New York, Raven Press), pp. 1-14.
27. Guerra-Crespo, M., Charli, J. L., Rosales-Garcia, V. H., Pedraza-Alva, G., and Perez-Martinez, L. (2003). Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neurosci Methods* 127, 179-192.
28. Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J. L., and Pérez-Martínez, L. (2001). BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci* 14, 483-494.
29. Guerra-Crespo, M. (2004) Estudio de la biosíntesis de la TRH en etapa de diferenciación terminal en cultivos primarios de hipotálamo fetal. Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México.
30. Hempstead, B. L. (2002). The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* 12, 260-267.
31. Heuer, H., Schafer, M. K., O'Donnell, D., Walker, P., and Bauer, K. (2000). Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol* 428, 319-336.
32. Hogan, B., Beddington, R., Costantini, F., Lacy, E. (1994). *Manipulating the mouse embryo*, 2nd edn (New York, Cold Spring Harbor Lab. Press).
33. Hoyos, B., Jiang, S., and Hammerling, U. (2005). Location and functional significance of retinol-binding sites on the serine/threonine kinase, c-Raf. *J Biol Chem* 280, 6872-6878.
34. Huang, E. J., and Reichardt, L. F. (2003). Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. *Annu Rev Biochem* 72, 609-642.
35. Joseph-Bravo, P., Perez-Martinez, L., Lezama, L., Morales-Chapa, C., and Charli, J. L. (2002). An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Brain Res Protoc* 9, 93-104.
36. Joseph-Bravo, P., Uribe, R. M., Vargas, M. A., Perez-Martinez, L., Zoeller, T., and Charli, J. L. (1998). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 18, 231-247.
37. Knusel, B., Gao, H., Okazaki, T., Yoshida, T., Mori, N., Hefti, F., and Kaplan, D. R. (1997). Ligand-induced down-regulation of Trk messenger RNA, protein and tyrosine phosphorylation in rat cortical neurons. *Neuroscience* 78, 851-862.
38. Koller, K. J., Wolff, R. S., Warden, M. K., and Zoeller, R. T. (1987). Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7329-7333.
39. Kryl, D., Yacoubian, T., Haapasalo, A., Castren, E., Lo, D., and Barker, P. A. (1999). Subcellular localization of full-length and truncated Trk receptor isoforms in polarized neurons and epithelial cells. *J Neurosci* 19, 5823-5833.
40. Kusano, K., House, S. B., and Gainer, H. (1999). Effects of osmotic pressure and brain-derived neurotrophic factor on the survival of postnatal hypothalamic oxytocinergic and vasopressinergic neurons in dissociated cell culture. *J Neuroendocrinol* 11, 145-152.

41. Lee, D., Huang, W., Copolov, D. L., and Lim, A. T. (1995). Glucocorticoids inhibit D1B, but not D2, receptor-mediated effects on hypothalamic atrial natriuretic factor neurons. *Endocrinology* *136*, 5570-5576.
42. Lee, S. L., Stewart, K., and Goodman, R. H. (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* *263*, 16604-16609.
43. Liu, L. X., Lu, H., Luo, Y., Date, T., Belanger, A. J., Vincent, K. A., Akita, G. Y., Goldberg, M., Cheng, S. H., Gregory, R. J., and Jiang, C. (2002). Stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* *291*, 908-914.
44. Loudes, C., Petit, F., Kordon, C., and Faivre-Bauman, A. (2000). Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* *72*, 144-153.
45. Marmigere, F., Choby, C., Rage, F., Richard, S., and Tapia-Arancibia, L. (2001). Rapid stimulatory effects of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on somatostatin release and intracellular calcium rise in primary hypothalamic cell cultures. *Neuroendocrinology* *74*, 43-54.
46. McAllister, A. K. (2001). Neurotrophins and neuronal differentiation in the central nervous system. *Cell Mol Life Sci* *58*, 1054-1060.
47. McAllister, A. K., Katz, L. C., and Lo, D. C. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* *22*, 295-318.
48. Michaud, J. L. (2001). The developmental program of the hypothalamus and its disorders. *Clin Genet* *60*, 255-263.
49. Michaud, J. L., Rosenquist, T., May, N. R., and Fan, C. M. (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev* *12*, 3264-3275.
50. Montagne, J. J., Ladram, A., Nicolas, P., and Bulant, M. (1999). Cloning of thyrotropin-releasing hormone precursor and receptor in rat thymus, adrenal gland, and testis. *Endocrinology* *140*, 1054-1059.
51. Muller, Y. L., Reitstetter, R., and Yool, A. J. (1998). Regulation of Ca²⁺-dependent K⁺ channel expression in rat cerebellum during postnatal development. *J Neurosci* *18*, 16-25.
52. Nakai, S., Kawano, H., Yudate, T., Nishi, M., Kuno, J., Nagata, A., Jishage, K., Hamada, H., Fujii, H., Kawamura, K., and et al. (1995). The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse. *Genes Dev* *9*, 3109-3121.
53. Nawa, H., Bessho, Y., Carnahan, J., Nakanishi, S., and Mizuno, K. (1993). Regulation of neuropeptide expression in cultured cerebral cortical neurons by brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* *60*, 772-775.
54. Nawa, H., Carnahan, J., and Gall, C. (1995). BDNF protein measured by a novel enzyme immunoassay in normal brain and after seizure: partial disagreement with mRNA levels. *Eur J Neurosci* *7*, 1527-1535.
55. Ninkina, N., Adu, J., Fischer, A., Pinon, L. G., Buchman, V. L., and Davies, A. M. (1996). Expression and function of TrkB variants in developing sensory neurons. *Embo J* *15*, 6385-6393.
56. O'Leary, R., and O'Connor, B. (1995). Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* *65*, 953-963.
57. Patterson, P. H., and Nawa, H. (1993). Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. *Cell* *72 Suppl*, 123-137.
58. Paxinos, G., Watson, Charles (1986). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 2 edn (San Diego, Academic Press).
59. Academic Press).
60. Perez-Martinez, L., Carreon-Rodriguez, A., Gonzalez-Alzati, M. E., Morales, C., Charli, J. L., and Joseph-Bravo, P. (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* *68*, 345-354.

61. Pérez-Martínez, L., Charli, J. L., and Joseph-Bravo, P. (2001). Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Dev Brain Res* 130, 73-81.
62. Pérez-Martínez, L., Uribe R.M., Sánchez, E., Carreón-Rodríguez, A., Chavez, L., Zacarías, M., Joseph-Bravo, P. and Charli, J.L. (1999). Regulation of TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of rodent hypothalamus. *Curr Topics in Neurochem* 2, 79-87.
63. Petit, F., Huicq, S., Gardette, R., Epelbaum, J., Loudes, C., Kordon, C., and Faivre-Bauman, A. (2002). The neurotrophins NT3 and BDNF induce selective specification of neuropeptide coexpression and neuronal connectivity in arcuate and periventricular hypothalamic neurons in vitro. *Neuroendocrinology* 75, 55-69.
64. Powell, M. J., Thompson, S. A., Tone, Y., Waldmann, H., and Tone, M. (2000). Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region. *J Immunol* 165, 292-296.
65. Rage, F., Riteau, B., Alonso, G., and Tapia-Arancibia, L. (1999). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* 140, 909-916.
66. Ringstedt, T., Lagercrantz, H., and Persson, H. (1993). Expression of members of the trk family in the developing postnatal rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 72, 119-131.
67. Rios, M., Fan, G., Fekete, C., Kelly, J., Bates, B., Kuehn, R., Lechan, R. M., and Jaenisch, R. (2001). Conditional deletion of brain-derived neurotrophic factor in the postnatal brain leads to obesity and hyperactivity. *Mol Endocrinol* 15, 1748-1757.
68. Ryan, A. K., and Rosenfeld, M. G. (1997). POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev* 11, 1207-1225.
69. Sakurai, T., Amemiya, A., Ishii, M., Matsuzaki, I., Chemelli, R. M., Tanaka, H., Williams, S. C., Richardson, J. A., Kozlowski, G. P., Wilson, S., *et al.* (1998). Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 92, 573-585.
70. Sanchez, E., Charli, J. L., Morales, C., Corkidi, G., Seidah, N. G., Joseph-Bravo, P., and Uribe, R. M. (1997). Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res* 761, 77-86.
71. Sánchez, E., Uribe, R. M., Corkidi, G., Zoeller, R. T., Cisneros, M., Zacarías, M., Morales-Chapa, C., Charli, J. L., and Joseph-Bravo, P. (2001). Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 74, 407-422.
72. Schmidt-Nielsen, K. (1986). Hormonal Control. En: *Animal Physiology, Fifth edn* (N. Y. USA).
73. Schonemann, M. D., Ryan, A. K., McEvelly, R. J., O'Connell, S. M., Arias, C. A., Kalla, K. A., Li, P., Sawchenko, P. E., and Rosenfeld, M. G. (1995). Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev* 9, 3122-3135.
74. Segerson, T. P., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H. J., Wu, P., Jackson, I. M., and Lechan, R. M. (1987). Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization. *Endocrinology* 121, 98-107.
75. Shimoke, K., Utsumi, T., Kishi, S., Nishimura, M., Sasaya, H., Kudo, M., and Ikeuchi, T. (2004). Prevention of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by brain-derived neurotrophic factor in cultured cerebral cortical neurons. *Brain Res* 1028, 105-111.
76. Sidman, R. K., Bela; Misra, Bijoy; Senft, Stephen. High resolution mouse brain atlas.
77. Snider, W. D. (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* 77, 627-638.
78. Sommerfeld, M. T., Schweigreiter, R., Barde, Y. A., and Hoppe, E. (2000). Down-regulation of the neurotrophin receptor TrkB following ligand binding. Evidence for an involvement of the proteasome and differential regulation of TrkA and TrkB. *J Biol Chem* 275, 8982-8990.

79. Spergel, D. J., Kruth, U., Hanley, D. F., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1999). GABA- and glutamate-activated channels in green fluorescent protein-tagged gonadotropin-releasing hormone neurons in transgenic mice. *J Neurosci* 19, 2037-2050.
80. Stevenin, B. L., S.L. (1995). Hormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone (TRH) gene. *The Endocrinologist* 5, 286-296.
81. Strand, F. L. (1999). *Neuropeptides: Regulators of physiological processes* (Cambridge, MIT Press).
82. Tapia-Arancibia, L., Rage, F., Givalois, L., and Arancibia, S. (2004). Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. *Front Neuroendocrinol* 25, 77-107.
83. Wang, W., and Lufkin, T. (2000). The murine *Otp* homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* 227, 432-449.
84. Yamada, M., Radovick, S., Wondisford, F. E., Nakayama, Y., Weintraub, B. D., and Wilber, J. F. (1990). Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol* 4, 551-556.

APENDICE

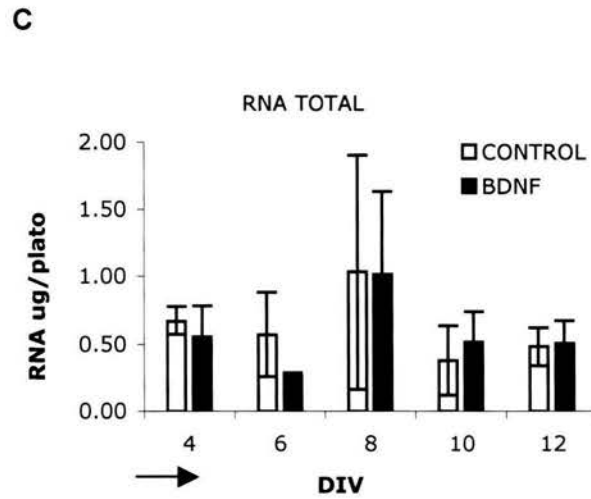
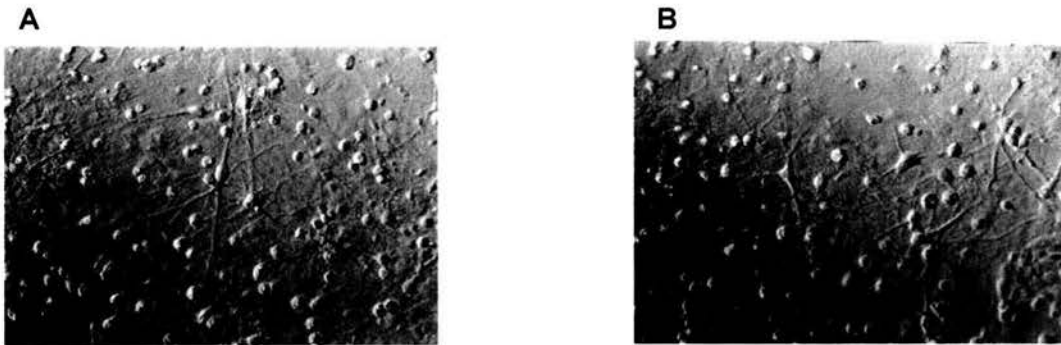


Figura suplementaria 1. Efecto del BDNF sobre la morfología celular y los niveles del mRNA total en cultivos hipotalámicos neonatales. Microfotografía de células hipotalámicas control (A) o estimuladas (B) con BDNF (por 4 DIV) a los 12 DIV de cultivo; Ampliación original 20X. C), Contenido total de RNA a lo largo del cultivo estimulado con BDNF durante cuatro días y mantenido hasta 12 días *in vitro*. Se muestra el promedio de 3 ó 4 pozos de cultivo para el control y los experimentales. La flecha indica el tiempo de estímulo con BDNF.

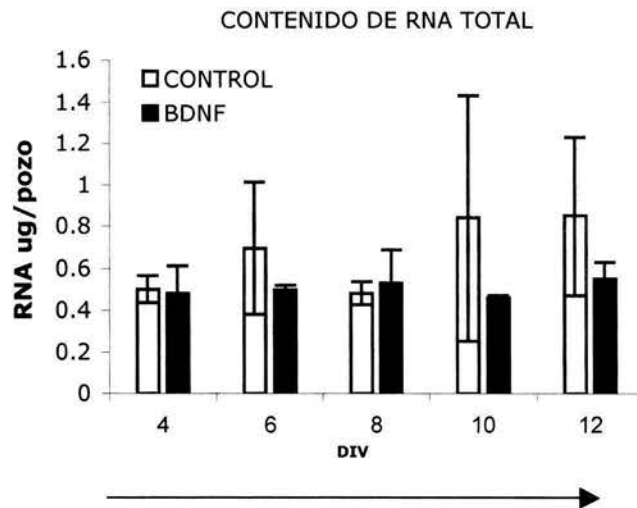


Figura suplementaria 2. Contenido total de RNA a lo largo del cultivo estimulado con BDNF durante doce días. Se muestra el promedio de 8 ó 9 pozos para el control y los experimentales. La flecha indica el tiempo del estímulo con BDNF.

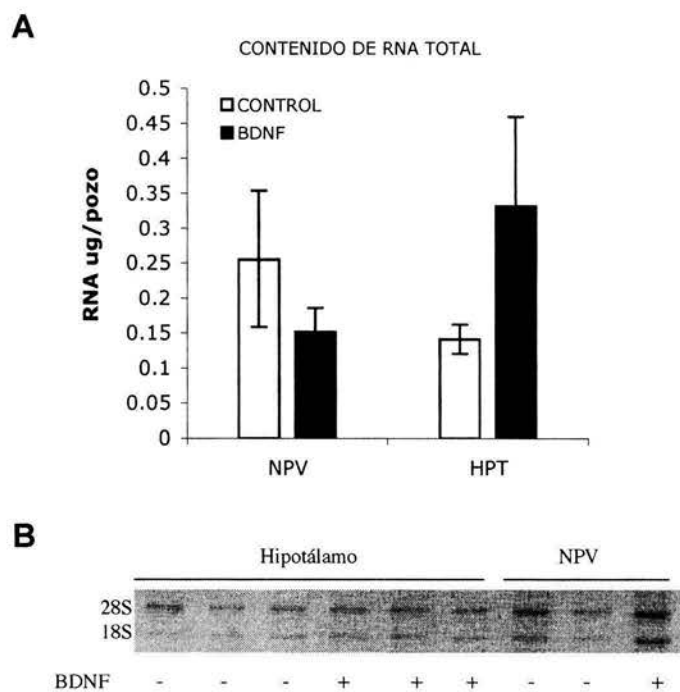
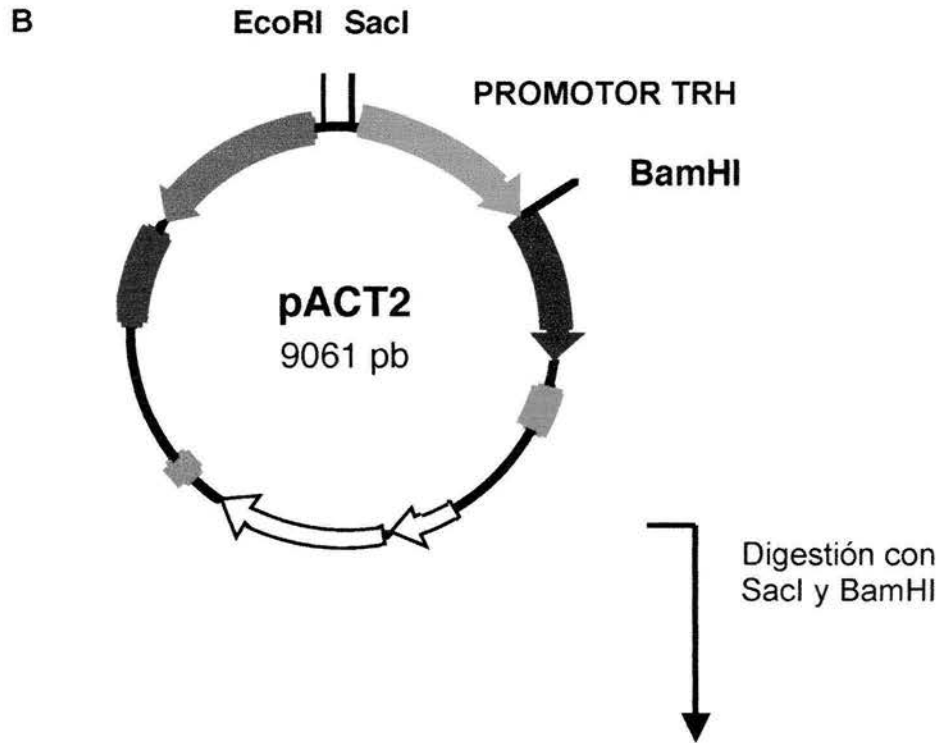
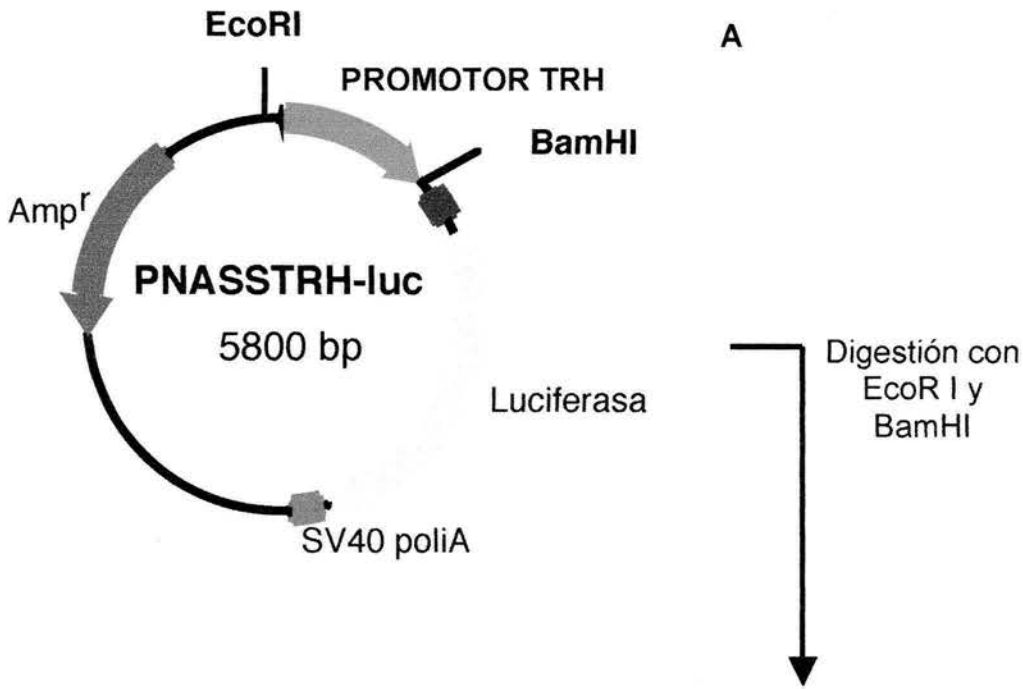


Figura suplementaria 3. A) Contenido total de RNA a lo largo del cultivo estimulado con BDNF durante cuatro días *in vitro*. Se muestra el promedio de 2 experimentos independientes por triplicado o cuadruplicado (\pm error estándar). **B)** Electroforésis representativa en condiciones desnaturalizantes de RNA total de muestras del cultivo de hipotálamo y NPV.



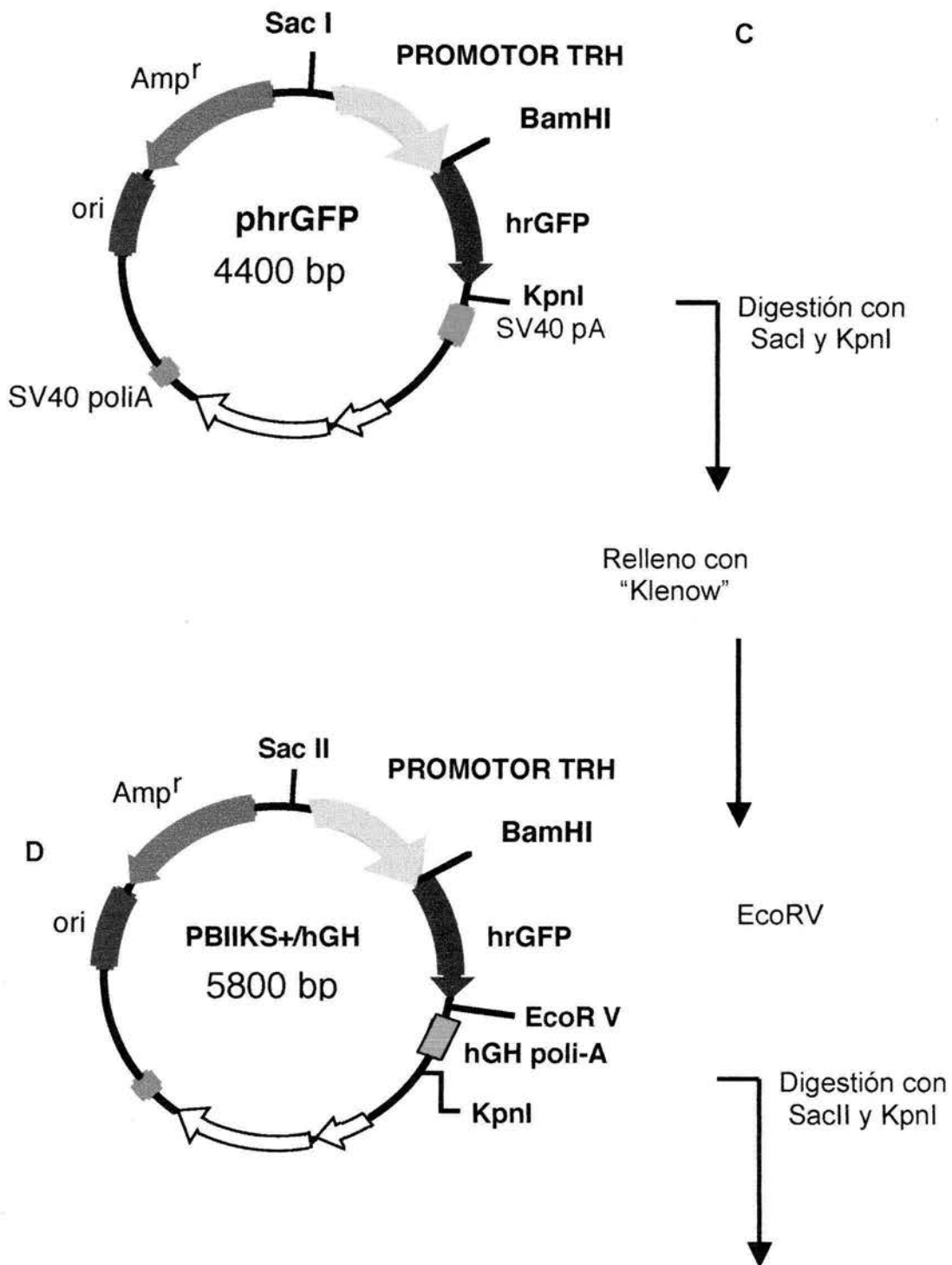


Figura suplementaria 4. Se muestran los mapas de los vectores utilizados para la generación del fragmento usado para la microinyección de los ovocitos. **A**, vector PNASSTRH-Luc en el que se indican los sitios de restricción utilizados para extraer el fragmento de la región promotora del gene de TRH (-776 a + 84 pb). **B**, vector pACT2 (Clontech), el cual fue usado para subclonar el fragmento de la región promotora. **C**, vector phr-GFP usado para insertar el fragmento correspondiente al promotor de TRH fusionado a la secuencia codificante de GFP. **D**, vector pBIKS+/hGH, usado para subclonar el fragmento TRH-GFP.

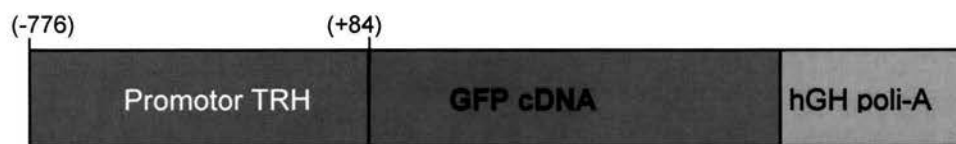


Figura suplementaria 5. Esquema que ilustra al fragmento utilizado para la microinyección de los ovocitos para la generación de los ratones transgénicos. Los números entre paréntesis indican la longitud de la secuencia promotora del gene de TRH (recuadro azul). La longitud del fragmento es de aproximadamente 2.1 Kb.