



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Modo de acción del receptor de
glucocorticoides sobre la transcripción del
gen de TRH.”**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIÓLOGO

PRESENTA:

Ana Alicia Sánchez Tusie.

TUTORA:

Dra. Martha Yadira Díaz Gallardo.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos de jurado

Datos del alumno:

Sánchez
Tusie
Ana Alicia
01777 1002621
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Licenciatura en Biología
402115917

Datos

Tutor

Dra.
Díaz
Gallardo
Martha Yadira

Datos sinodal 1

Dra.
Joseph
Bravo
Patricia

Datos sinodal 2

Dra.
de Gortari
Gallardo
Patricia Bertha Judith

Datos sinodal 3

Dr.
Puente
García
José Luís

Datos sinodal 4

Quím.
Escobar
Sánchez
Viviana

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Martha Yadira Díaz Gallardo y se financió principalmente con el donativo DGAPA **IN- 215507** y CONACYT **43503-Q**.

Agradecimientos.

Agradezco a la Dra. Patricia Joseph Bravo y al Dr. Jean Louis Charli, por el apoyo recibido durante mi estancia en el laboratorio.

También a muchos del laboratorio de neurobiología por su apoyo técnico para este trabajo; a la Dra. Martha Yadira Díaz Gallardo, a la Dra. Antonieta Cote Vélez, a la Dra. Rosa María Uribe, a la Dra. Leonor Pérez Martínez, al Dr. Miguel Ángel Vargas, al QFB. Miguel Cisneros Ramírez, a la Quím. Fidelia Romero, a José Manuel Villa, a Miguel Ángel Olvera, a la Sra. Elena Martel y al Sr. Sergio González por el apoyo recibido en el bioterio del Instituto de Biotecnología.

A Candy, Karla, Ivan y por supuesto a Carlos por todo el apoyo personal recibido.

A Ernesto por la paciencia, el apoyo y cariño.

El trabajo es y será para Maris.....

Es un orgullo ser mexicana y ser egresada de la UNAM, de estudiar en la 68 mejor del mundo, patrimonio cultural de la humanidad, de desarrollarme en áreas deportivas, artísticas, culturales y científicas. La UNAM es un ejemplo de la enriquecedora diversidad cultural de éste bello país, tuve la gran oportunidad de ser alumna de los mejores profesores del país, gente convencida de que la ciencia y la tecnología es la base de cualquier economía y que si México no se preocupa por formar científicos que generen tecnología y que se preocupen por el cuidado del medio ambiente, no dejaremos de ser un país de maquila.

Gracias UNAM.

ÍNDICE

página

I	RESUMEN.....	7
II	INTRODUCCIÓN.....	9
III	ANTECEDENTES.....	12
	La hormona liberadora de Tirotropina.....	12
	Biosíntesis de TRH	14
	Estructura del gen de TRH	14
	Regulación de la Biosíntesis de TRH	15
IV	JUSTIFICACIÓN.....	18
V	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	18
VI	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	19
VII	MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
	Cultivo primario de células fetales hipotalámicas	21
	Purificación de plásmidos	22
	Características de los plásmidos	23
	Transfección de cultivos primarios hipotalámicos	23
	Tratamiento y cosecha	24
	Determinación de la concentración de proteínas	24
	Ensayo de la actividad de luciferasa	25
	Ensayo de la actividad de β -galactosidasa	26
	Normalización de la actividad de luciferasa	26
	Presentación de los datos y análisis estadístico	27
VIII	RESULTADOS.....	28
	Desarrollo morfológico de los cultivos	28
	Contenido de proteína	28
	Actividad específica de la β -galactosidasa	29
	Expresión basal de los vectores control	31
	Efecto de los tratamientos en la actividad de luciferasa a los 8DIV	31
IX	DISCUSIÓN.....	35
X	CONCLUSIÓN.....	38
XI	REFERENCIAS.....	39
XII	GLOSARIO.....	50
XIII	APÉNDICE.....	51

Resumen.

La hormona liberadora de tirotrópina (TRH) pertenece a una familia de mensajeros intercelulares conocidos como péptidos. La TRH con actividad hipofisiotrópica es sintetizada y liberada por el núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo hacia la eminencia media, desde donde se envían terminales nerviosas a la hipófisis anterior, en donde la TRH estimula la síntesis y liberación de hormona estimulante de tiroides (TSH) así como, la síntesis y liberación de prolactina (PRL) y, en ciertos casos, de la hormona de crecimiento (hGH). La biosíntesis de TRH en el NPV esta sujeta a regulación por múltiples estímulos tanto físicos como fisiológicos. Entre ellos destacan las hormonas tiroideas, los glucocorticoides, la leptina, el frío, la succión, el ayuno y la inanición. Datos previos *in vitro* han demostrado que los niveles de RNAm de TRH aumentan en forma rápida (1 a 3 horas) en respuesta al estímulo con un análogo sintético del AMPc, 8Bromo-adenosin-monofosfato cíclico (8Br-AMPc) o con el análogo de glucocorticoides, la dexametasona (Dex). El 8Br-AMPc activa a la vía de señalización dependiente de la proteína cinasa A (PKA) la cual fosforila a la proteína de unión al elemento de respuesta del AMPc (CREB-P). Por otro lado, la Dex es capaz de unirse al receptor de glucocorticoides (GR) el cual, es traslocado al núcleo uniéndose al elemento de respuesta de glucocorticoides (GRE). De manera interesante, la incubación de ambas no causa un efecto aditivo, la Dex disminuye el efecto estimulador del 8Br-AMPc.

En el promotor del gen de TRH de rata, CREB-P reconoce dos secuencias responsivas denominados elementos de respuesta a AMPc (CRE) cuya secuencia es TGACCTCA y su posición relativa se localiza a -59pb/-52pb (CRE-1) y TGCCGTCA en -101pb/-94pb (CRE-2) respecto al sitio de inicio transcripcional. Por su parte, GR reconoce a los medios sitios GRE TGTCT en: -735pb, -560pb y -210pb, así como un sitio invertido parecido al consenso (GGTCCAcacTCT TGT) en -284pb y dos medios sitios invertidos TCTTGT en -275pb y -310pb. Al fragmento -216pb/-199pb se le denomina GRE compuesto ya que, en la cadena complementaria al sitio GRE -210pb/-205pb se encuentran dos sitios AP-1 (ATCAGT) que lo flanquean. El sitio de unión AP-1 es comúnmente reconocido por homodímeros de c-Jun o heterodímeros c-Jun/c-Fos, la actividad de los cuales es modulada por factores de crecimiento y citocinas vía proteínas cinasas activadas por mitógeno.

Mediante ensayos de protección a DNasa (footprinting) se han podido determinar las regiones del promotor en las cuales se unen factores de transcripción en respuesta a los estímulos con 8Br-AMPc y/o Dex. Cuando los cultivos primarios hipotalámicos son estimulados con 8Br-AMPc, se observa una zona de protección en el sitio AP-1 a -203pb/-197pb. Esta zona de protección no se observa al estimular con Dex. Sin embargo, se observa una zona protegida correspondiente al sitio GRE compuesto a -210pb/-205pb. Por el contrario, cuando las células son estimuladas conjuntamente con 8Br-AMPc y Dex ambas zonas de protección se pierden.

Esto sugiere que la estimulación con ambas drogas evita la unión de factores de transcripción a sus respectivas secuencias blanco, quizá a través de una competencia por los sitios unión sobrelapantes que evitan su pegado al DNA inhibiendo así la transcripción del RNAm de pro-TRH, o bien a través de una interacción entre los factores de transcripción estimulados que eviten su unión a DNA.

Para determinar la manera en la que GR participa ante estos dos estímulos ya sea compitiendo por el sitio de unión o interaccionando con otras proteínas, se transfectaron cultivos primarios de hipotálamo de rata con; (a) el vector luciferasa bajo el control del promotor de TRH (TRH-luc -776/+85) junto con (b) el vector conteniendo el DNA complementario (DNAC) para GR silvestre (GRwt), o el GR deficiente a la unión al DNA (GR L501P), o bien el GR con una triple mutación en tres importantes sitios de fosforilación (GRtm: T171A, S224A, S246A) que le impiden interactuar con otras proteínas. Las células transfectadas se estimularon con 8Br-AMPC, Dex o ambas drogas. Observamos un aumento del 75% en la actividad del reportero con respecto al control al estimular con 8Br-AMPC, un 65% de aumento cuando se estimularon con Dex y un aumento del 25% cuando las células son estimuladas con ambas drogas. En las células transfectadas con el GR L501P observamos; un aumento del 40% con respecto al control al estimular con 8Br-AMPC y 25% más en la actividad del reportero con respecto al control cuando se estimularon con Dex o con ambas drogas. En las células transfectadas con el GRtm se observó; un 60% de aumento con respecto al control al estimular con 8Br-AMPC, 10% más en la actividad del reportero con respecto al control cuando se estimularon con Dex y una disminución del 10% cuando las células son estimuladas con ambas drogas.

Nuestro propósito al trabajar con estas versiones del receptor de glucocorticoides (GR L501P y GRtm) era poder abatir la interferencia de la Dex al efecto estimulador del 8Br-AMPC y poder determinar el mecanismo por el cual GR participa en la incubación con ambas drogas. Los resultados obtenidos apoyan la necesidad de la unión del GR al DNA para estimular la transcripción del gen de TRH. La posibilidad de una interferencia entre GR y CREB-P u otro factor de transcripción por medio de interacciones protéicas no fueron evidentes por lo que será necesario trabajar con otras mutaciones en el GR para poder identificar los sitios importantes en el GR implicados en esta interferencia.

Introducción.

El cerebro, integrando una variedad de estímulos que se originan tanto del medio interno como del externo, permite al organismo responder a estímulos sensoriales, controlar los movimientos, aprender y recordar, generar emociones, coordinar las funciones endocrinas y las autónomas (Charli & Joseph 2007). El cerebro de los vertebrados, junto con el cerebelo y la médula espinal forman el sistema nervioso central (SNC) que se comunica con los órganos periféricos a través de nervios que salen del tallo cerebral y de la médula espinal (sistema nervioso periférico, SNP) (Eckert *et al.*, 1994).

Las propiedades especiales del sistema nervioso se deben a las características de las neuronas, y a su patrón de organización (Bear *et al.*, 2001). Las neuronas tienen una región central o soma, de la cual se desprenden unas extensiones que se ramifican, llamadas dendritas, y otra extensión única, a veces muy larga, llamada axón, de donde pueden surgir varias ramificaciones que terminan en un ensanchamiento que se llama una terminal nerviosa. Asociados en paralelo, los axones forman los nervios (Bear *et al.*, 2001). En el soma de la neurona se localizan el núcleo, los ribosomas, el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi en donde se sintetizan y empaquetan las proteínas, en gránulos de secreción que son transportados a lo largo del axón hasta la terminal nerviosa (Bear *et al.*, 2001). Los neurotransmisores "clásicos" se sintetizan en la terminal nerviosa donde las enzimas responsables de su síntesis han viajado desde el soma. En la terminal nerviosa, los neurotransmisores son concentrados en las vesículas sinápticas, por proteínas llamadas transportadores vesiculares. Cada uno de los neurotransmisores cuenta con receptores específicos localizados en la membrana plasmática de dendritas, soma o incluso, de la terminal nerviosa (Bear *et al.*, 2001).

Cada neurona puede recibir muchos contactos sinápticos de distintas células provenientes de diversas regiones del sistema nervioso y a su vez incidir en muchas otras células, a través de los contactos sinápticos que establecen las terminales nerviosas de cada rama del axón. En general, cada neurona sintetiza un neurotransmisor clásico y existe una asociación estable entre la localización de una neurona y el tipo de neurotransmisor que sintetiza (Charli & Joseph 2007). Posterior a la identificación de los neurotransmisores "clásicos" se empezaron a reconocer otras moléculas capaces de afectar la actividad cerebral. Su naturaleza química es muy variada; algunas reconocidas antes como hormonas periféricas (esteroides), proteínas, un gran número de péptidos, derivados lipídicos como los que actúan sobre los receptores del principio activo de la marihuana (endocannabinoides), nucleótidos (ATP) y, hasta gases como el NO y el CO (Charli & Joseph 2007).

Los péptidos constituyen una gran familia de moléculas que participan en la comunicación celular en todos los reinos de la vida (Eckert *et al.*, 1994). Su biosíntesis, liberación, acción e

inactivación tienen algunas diferencias clave cuando se comparan a los neurotransmisores clásicos. En las neuronas los péptidos son sintetizados en el retículo endoplásmico rugoso, en forma de proteínas de alto peso molecular que son empacados, junto con las enzimas procesadoras, en el trans Golgi en gránulos de la vía de secreción regulada. Las proteínas precursoras son procesadas por la acción secuencial de varias enzimas, siendo un evento inicial la actividad de las convertasas, enzimas que hidrolizan la cadena peptídica de manera controlada al nivel de pares de aminoácidos básicos (lys, arg). En seguida una carboxipeptidasa remueve generalmente los aminoácidos básicos. Se pueden formar así varios péptidos, a partir de un solo precursor, con actividades biológicas distintas como es el caso de la pro-opiomelanocortina que es procesada a corticotropina y lipotropina, y éstos a su vez a otros péptidos activos como la α -melanotropina y la β -endorfina. Los gránulos de secreción se acumulan en la terminal nerviosa conteniendo a este nivel, los péptidos procesados. Estos gránulos se fusionan con la membrana plasmática en respuesta a la llegada de trenes de potenciales de acción o en respuesta a neurotransmisores cuyos receptores estén cercanos a la terminal nerviosa. Los péptidos liberados al espacio sináptico actúan sobre receptores, a veces localizados lejos del sitio de liberación, que son proteínas transmembranales, casi siempre de tipo metabotrópico. Por lo tanto, los péptidos no afectan rápidamente al potencial de membrana como los receptores de algunos neurotransmisores clásicos que son canales. Actúan en forma más lenta y pueden modular la actividad de neurotransmisores clásicos, por lo que se les ha clasificado en la categoría general de neuromoduladores (Bear *et al.*, 2001). Su inactivación opera principalmente por la acción de ectoenzimas, de manera análoga a la inactivación de la acetilcolina (Charli & Joseph 2007).

El reconocimiento de los péptidos como una gran familia de moléculas mensajeras inicia en la década de los 70s con el descubrimiento de los péptidos hipotalámicos. El hipotálamo es una región del cerebro que integra señales de diversas fuentes a un camino final común, las neuronas hipotalámicas regulan la función endocrina al controlar la pituitaria anterior, un director de la orquesta endocrina. Las neuronas hipotalámicas que proyectan sus terminales hacia la eminencia media liberan las neurohormonas hacia el sistema porta-hipofisario que las transporta hacia la adenohipófisis (neuronas hipofisiotrópicas); otras, proyectan hacia la neurohipófisis o hipófisis posterior de donde se secretan la oxitocina y la vasopresina. La adenohipófisis (también denominada glándula pituitaria) se le considera la "glándula maestra" ya que las hormonas secretadas por ésta, en respuesta a la señal de las neurohormonas actúan directamente sobre diversas glándulas (Charli & Joseph 2007).

En respuesta a distintos tipos de estímulos, tanto físicos como fisiológicos las neuronas hipofisiotrópicas liberan las neurohormonas, dependiendo del estímulo. Existe una alta especificidad en su función, definidos en ejes neuroendócrinos de intercomunicación llamados ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco (Akil H. *et al.*, 1999). Los ejes mejor conocidos de

regulación neuroendócrina son: a) el eje hipotálamo-hipófisis–adrenal (HHA); b) el eje hipotálamo-hipófisis–hígado (HHH); c) el eje hipotálamo-hipófisis–gónadas (HHG); d) el eje hipotálamo–hipófisis–glándula mamaria (HHM); y, e) el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). Todos estos ejes tienen características similares, en respuesta a un estímulo neuronal el hipotálamo libera la neurohormona (factor liberador) que controla la síntesis y liberación de una hormona hipofisiaria específica (Charli & Joseph 2007).

La eficiencia de la transmisión sináptica depende de la tasa de secreción de la molécula efectora (neurotransmisor o neuropéptido), de la unión de ésta a su receptor, de los mecanismos de transducción a nivel del receptor y de la velocidad de eliminación (Bear *et al.*, 2001). Todos los neuropéptidos se unen a receptores membranales que se unen a proteínas G y activan varias vías intracelulares. Por ejemplo, la activación de la cinasa A (PKA) incrementa los niveles intracelulares de AMPc (segundo mensajero) repercutiendo a diferentes niveles, incluyendo la regulación de la expresión génica al incrementar la fosforilación del factor transcripcional CREB (cAMP response element binding protein). El CREB-P se une a una secuencia específica del DNA, denominada elemento de respuesta a CREB (CRE), presente en múltiples promotores. Debido a que CREB se encuentra en altas concentraciones, la respuesta celular es rápida pues no requiere de la síntesis de otras proteínas como puede ser el caso de otro factor de transcripción, AP-1 que depende de la síntesis de Fos (Yumita *et al.*, 2003).

Las hormonas adrenales, gonadales ó tiroideas son moléculas lipofílicas cuyos receptores se localizan al interior de la célula y posterior a la unión de la hormona, se translocan al núcleo donde funcionan como receptores de transcripción. Además de tener un efecto de retroalimentación negativa sobre la síntesis de las hormonas hipofisiaria e hipotalámica involucradas en su regulación, tienen efectos sobre múltiples células que expresan sus receptores. Por ejemplo, los glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en rata) participan en el metabolismo basal y han sido implicados en la regulación de una gran parte de los genes que codifican péptidos hormonales tanto en el SNC como en la hipófisis (Gouilleux F. 1999). La especificidad de la respuesta depende de la existencia de receptores específicos para estas hormonas. Para los glucocorticoides existen dos tipos; el tipo I (MR) presenta alta afinidad y se encuentra saturado en condiciones normales. El tipo II, o receptor a glucocorticoides (GR) presenta una afinidad menor y se postula es el que media las respuestas al incremento de glucocorticoides provocados en situaciones de estrés (Bamberger *et al.*, 1996). El GR es un receptor intracelular asociado a "heat shock proteins" (hsp); la unión del ligando induce un cambio conformacional en la molécula provocando una disociación del complejo GR/hsp así como una hiperfosforilación que permiten su translocación al núcleo (Hu LM *et al.*, 1994; Akner G *et al.*, 1994). Dentro del núcleo, el GR activado puede actuar de dos maneras. El mecanismo tipo 1 se caracteriza por la interacción de GR con secuencias específicas de DNA, mientras que el mecanismo tipo 2 involucra la interacción de GR con otros

factores de transcripción ante la ausencia de uniones específicas al DNA (Fig. 1). El mecanismo tipo 1 representa el modelo clásico de acción de GR. En este modelo, un homodímero del receptor se une al sitio GRE en regiones promotoras de genes blanco. GR, como la mayoría de los factores transcripcionales incluyendo a CREB-P, interactúa mediante sus dominios de transactivación con coactivadores y otros factores de transcripción basales. Esta interacción es suficiente para estabilizar el complejo de preiniciación en el promotor y potenciar la transcripción por la RNA polierasa tipo II (RNAPol II) (Tsai M-J, O'Malley BW, 1994). Además, la unión del homodímero de GR puede inducir un arreglo en la estructura de la cromatina en la región promotora respectiva, permitiendo que otros factores de transcripción se unan al DNA (Truss M *et al.*, 1995).

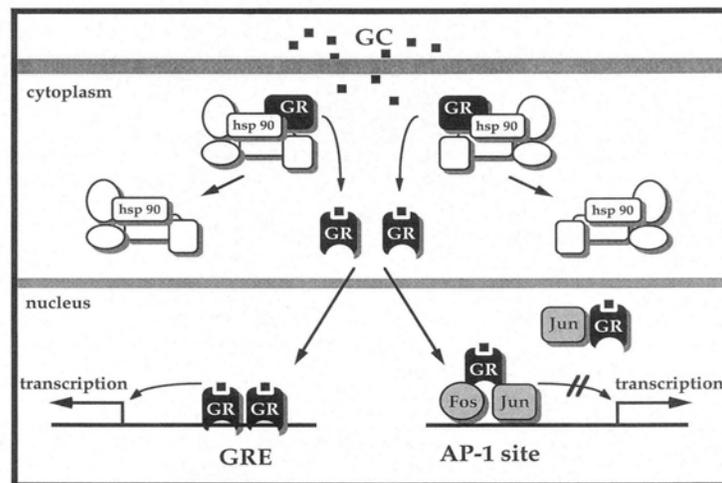


Figura 1. Modelo simplificado de la modulación transcripcional mediada por GR. La unión de la hormona al receptor causa una disociación del complejo GR/hsp, así como la translocación nuclear. Dentro del núcleo, el GR activado puede actuar de dos maneras: como se indica del lado izquierdo, se puede unir a GREs en la región reguladora de los genes blanco (mecanismo tipo 1). Esta interacción regula la actividad transcripcional de los genes blanco. En el mecanismo de tipo 2 (lado derecho) la interacción del receptor con otros factores de transcripción, como c-Jun provoca la inhibición de la tasa de transcripción de los genes blanco. GC, Glucocorticoides. (tomado de Bamberger *et al.*, 1996).

GABA, Glutamato, , el péptido relacionado con la proteína agouti (AGRP) y un transcrito regulado por anfetamina y cocaína (CART) y además, de otras regiones cerebrales como el tallo cerebral (cuyos neurotransmisores son noradrenalina ó serotonina) (Fekete *et al.*, 2005; Mitsuma *et al.*, 1987; Stocca *et al.*, 1996; al-Damluji *et al.*, 1993); se han detectado además receptores de las hormonas tiroideas y de glucocorticoides en las neuronas que expresan TRH en el NPV (Kakucska *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1996). La tasa de síntesis y liberación de la TRH se encuentra modulada por diferentes condiciones fisiológicas y experimentales (la lactancia, el ciclo estral, el ciclo circadiano, tiroidectomía, adrenalectomía, estrés, entre otras) (Segerson *et al.*, 1987; Arancibia *et al.*, 1983; Tsigos *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 1995; Covarrubias *et al.*, 1988; Uribe *et al.*, 1991). En el caso de estimulación por el frío o la succión, el aumento de los niveles del TRH se observan de forma rápida y transitoria (30-60min).

Biosíntesis de la TRH.

La TRH se origina de un precursor peptídico (prepro TRH) de 26kD. El transcrito de la rata y el ratón codifica para una proteína precursora que contiene 5 copias de gln-His-Pro-Gly, mientras el de humanos posee 6 y, el de *Xenopus* sólo 4 (Fuse Y. *et al.*, 1991; Lechan R.M. *et al.*, 1986; Richter K. *et al.*, 1984). Las convertasas (PC1/PC2), la peptidilglicina α -amida monooxigenasa (PAM) y la glutaminil ciclasa se encargan de modificar los extremos amino y carboxilo de la TRH activa (pglu-his-proNH₂) (Fig. 2) (Murdoch *et al.*, 1983, Nillni *et al.*, 1995).

Estructura del gen del TRH.

La unidad transcripcional del TRH corresponde a un gen único cuya secuencia se ha descrito tanto para humanos como para rata, rana, ratón y pollo (Richter *et al.*, 1984; Jackson *et al.*, 1983; Cao *et al.*, 1998; Vanderborne *et al.*, 2005). El gen contiene tres exones, el primero codifica para la región 5' no traducida del RNAm; el segundo, el péptido señal y la mayor parte de la región amino terminal y el último, el resto de la parte amino terminal, las cinco copias generadoras del tripéptido y varios péptidos intermedios así como la porción carboxiloterminal de la proteína y la región 3' no traducida (Fig. 3) (Lee S. L. *et al.*, 1988).

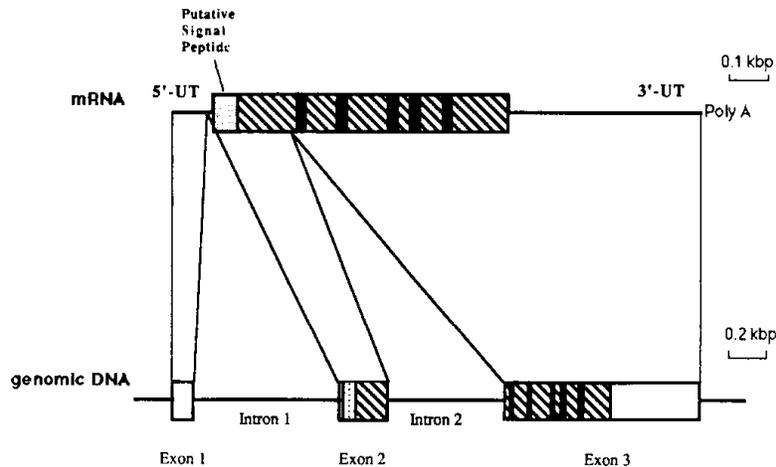


Figura 3. Estructura del gen codificante para pre-pro-TRH, en donde se observan los dos intrones (1= 750pb; 2 = 450pb) que separan los exones que codifican la proteína (abajo); y la estructura del mRNA (arriba) incluyendo la región traducida y las regiones 5' y 3' no traducidas. (Lee S.L. *et al.*, 1988).

Regulación de la biosíntesis de TRH.

La región reguladora de la síntesis de TRH esta comprendida entre -576 y +84 del gen de rata (Balkan *et al.*, 1998). La caja TATA típica (secuencia Goldberg-Hogness) se localiza en la posición -28 pares de bases (pb) respecto del sitio de inicio de la transcripción (+1). Contiene varios elementos de respuesta a factores de transcripción; por ejemplo, una región rica en GC a -119pb común para elementos de respuesta de proteína específica 1 (SP1) conocida como elemento de respuesta a SP1 (SP1RE) así como en la posición -238pb (ésta incluye al el elemento de respuesta al factor de crecimiento epidermal, EGFRE1). En las posiciones -59pb y -101pb se encuentran sitios propuestos como los sitios a los que se une la proteína de unión de AMPc (CREB), [denominados elementos de respuesta a AMPc (CRE)] ó el factor transcripcional AP-1 [elemento responsivo a TPA (TRE)]. El CRE-1 (-59pb) puede ser reconocido por el receptor de hormonas tiroideas (Lee S.L. *et al.*, 1988) (Fig. 4).

Los elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) se hayan distribuidos a todo lo largo de la región reguladora (revisado en Pérez- Martínez *et al.*, 1999). El promotor de TRH de rata carece de un GRE consenso (5'GGTACAnnnTGTCT 3'). Sin embargo, contiene múltiples copias del medio sitio de mayor afinidad (TGTCT) (Dahlman-Wright *et al.*, 1991) en -735pb, -560pb o -210pb, y un sitio invertido cercano al consenso (5'GGTCCAcacTCT TGT3') en -284pb, así como dos medios sitios invertidos en -275pb y -310pb (Lee *et al.*, 1988). El sitio -210pb/ -205pb une GR con mayor frecuencia que los otros GRE y es importante para la transcripción basal y para la respuesta a glucocorticoides (Lee *et al.*, 1996).

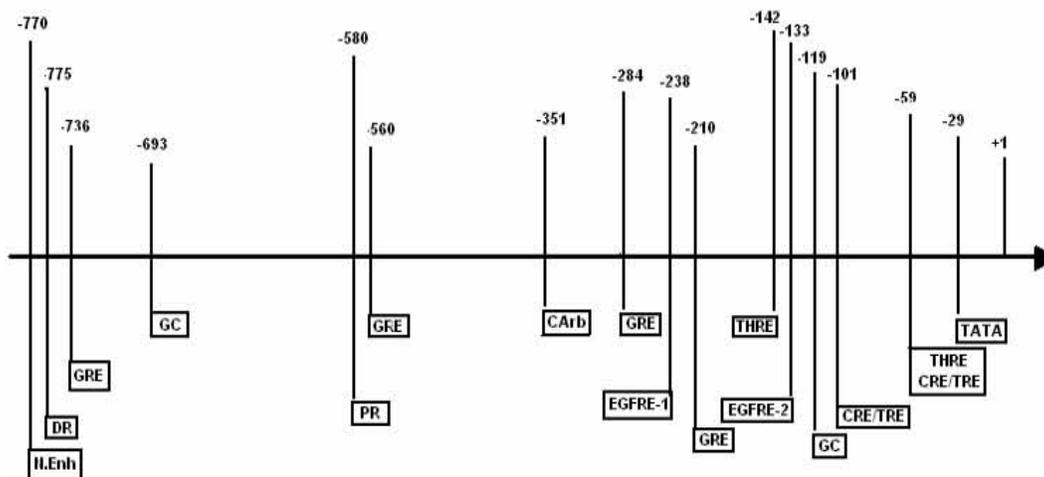


Figura 4. Elementos reguladores de la región promotora del TRH de rata en donde se describe la localización relativa de cada elemento consenso en relación con el sitio de inicio de la transcripción. (Adaptado de Pérez-Martínez *et al.*, 1999).

Todas las especies en las que se ha descrito el gen del TRH presentan elementos de respuesta para los factores transcripcionales AP-1, CREB-P y el receptor de glucocorticoides (GR). Esto sugiere que este gen es susceptible a la regulación mediada por vías de señalización que actúan a través de estos factores de transcripción. Los tratamientos con análogos permeables de AMPc (8Br-AMPc o dB-AMPc) en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas fetales, incrementan los niveles del RNAm de TRH desde la primera hora de tratamiento. Estos efectos están mediados por la activación de la PKA, ya que el bloqueador específico de ésta cinasa (H89) reduce la respuesta estimuladora producida por el 8Br-AMPc (Cote-Vélez A. *et al.*, 2005). Utilizando células transfectadas se ha demostrado que el aumento de los niveles de RNAm se debe a un efecto en la transcripción y se sugiere que la activación del factor transcripcional CREB-P, el cual es fosforilado por la PKA, puede estar participando (Cote-Vélez A. *et al.*, 2005).

Los glucocorticoides modulan la expresión del gen de TRH en modelos *in vivo* e *in vitro*. En animales adrenalectomizados se observó un incremento en el RNAm de la TRH en el NPV lo que sugirió que los glucocorticoides regulan negativamente su biosíntesis en dicha región hipotalámica (Kakuska *et al.*, 1992). Sin embargo, *in vitro* la corticosterona, ó su análogo la dexametasona, incrementa los niveles del RNAm de TRH en cultivos primarios de hipotálamo fetal (Pérez-Martínez *et al.*, 1998), del diencéfalo de rata (Bruhn *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1995), 0, de la línea celular de carcinoma tiroideo CA77 (Tavianini *et al.*, 1989). Los efectos en cultivos primarios hipotalámicos son dependientes del tiempo y de la dosis de exposición (Joseph-Bravo *et al.*, 1998; Pérez Martínez *et al.*, 1998). Sin embargo, la combinación de los tratamientos de

Dex y 8Br-AMPC reduce el incremento generado por el estímulo único con 8Br-AMPC (Pérez Martínez L. *et al.*, 1998). Esta interferencia tiene exigencias temporales sutiles, ya que no se observa cuando se preincuba por 10 minutos con glucocorticoides y luego se añade noradrenalina (NA); pero, al invertir el orden (10 minutos con NA seguida por la adición de corticosterona), el efecto estimulador disminuye significativamente (Joseph *et al.*, 2006).

Con el objetivo de identificar el mecanismo por el cual ocurre la interferencia entre AMPc y corticosterona se emplearon geles de súper retardo, que permitieron identificar algunas de las proteínas, obtenidas de células estimuladas con 8Br-AMPC y con Dex, que participan en la formación del complejo DNA-proteína en las regiones 101pb/-94pb (CRE-2) a P-CREB y c-Jun y, a 216pb/-199pb (GRE) a, GR y Jun. Este estudio permitió reconocer además que el CRE-1 (-59pb/-51pb) no presenta unión a proteínas nucleares (Cote Velez *et al.*, 2005) y se demostró el sitio -210pb/-205pb es en realidad un sitio GRE compuesto (GREc) ya que contiene en la cadena complementaria dos sitios de reconocimiento a AP1 (Cote et al., 2005) (Fig.5). El GREc, flanqueado por dos sitios AP-1, en contacto con las proteínas del cultivo estimulado con 8Br-AMPC, se detecta la presencia de GR, que pudiera sugerir un heterodímero de GR con Jun u otro factor estimulado por AMPc (Cote Velez *et al.*, 2005).

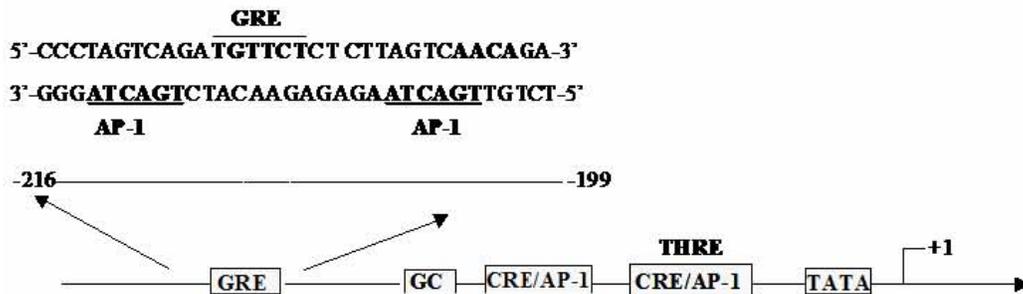


Fig. 5. Elementos regulatorios del promotor de TRH de rata. La región -216pb/-199pb presenta un sitio GRE compuesto (GREc) ya que contiene en la cadena complementaria dos sitios de reconocimiento a AP1 (Cote et al., 2005).

Ensayos de protección a DNasa I (footprinting) han mostrado que las zonas GRE -210pb/-205pb, AP1 -203pb/-197pb y CRE -101pb/-94pb del promotor no son susceptibles a digestión cuando son tratadas con proteínas nucleares de células que fueron conjuntamente tratadas con 8Br-AMPC y Dex (Díaz-Gallardo M. Y., no publicado). Esto sugiere que la activación simultánea de CREB, GR y c-Jun evita la unión a sus respectivas secuencias blanco. Debido a la cercanía entre los sitios, podríamos suponer una competencia alostérica por los sitios de unión o bien, por interacción entre sí o con otras proteínas puente que evitan su pegado al DNA.

Justificación.

El estudio de los mecanismos que explican la regulación de la biosíntesis de TRH por los glucocorticoides permite la comprensión de situaciones fisiológicas en las cuales el estrés tiene efectos deletéreos sobre el metabolismo y la homeostasis del eje tiroideo.

Objetivo:

El objetivo del presente trabajo es tratar de identificar si la unión de GR al promotor de TRH es esencial en los efectos de interferencia a la señal de AMPc descrita.

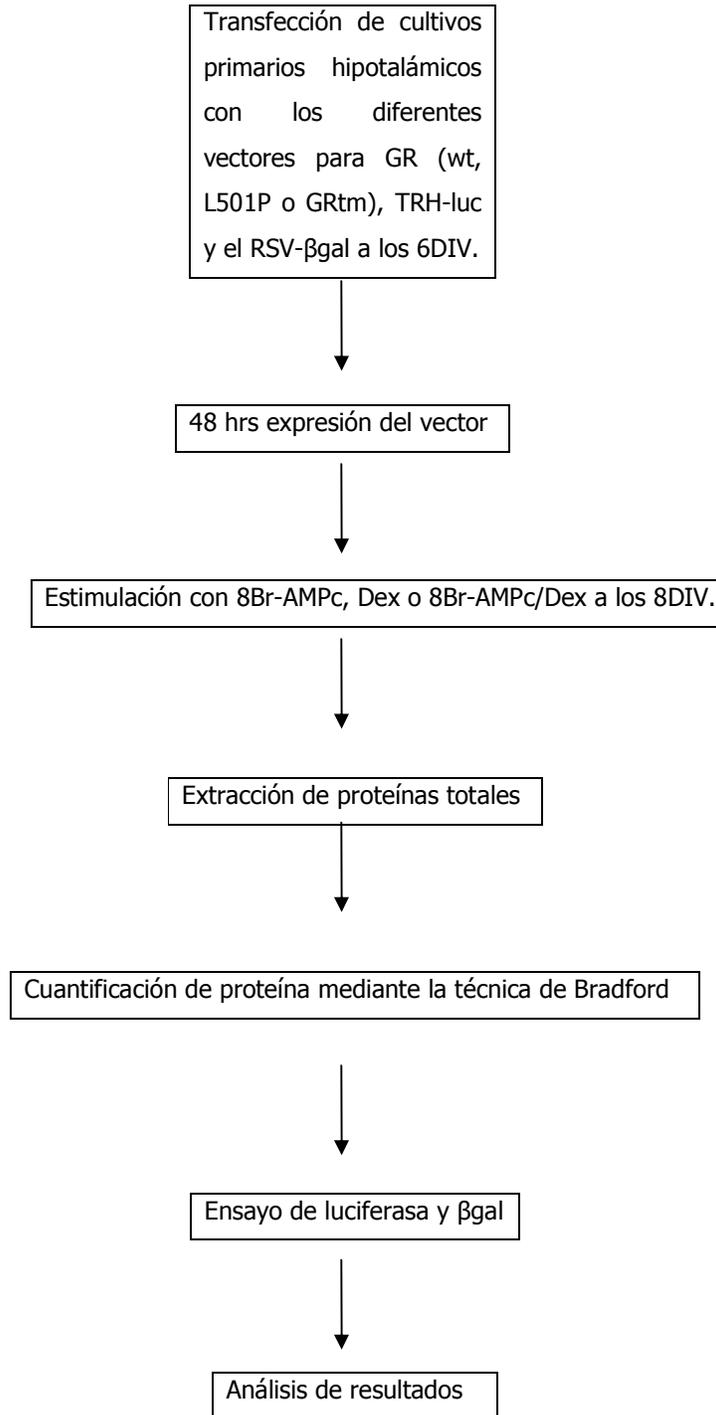
Hipótesis.

La estimulación de la transcripción del gen de TRH por glucocorticoides ocurre gracias a la unión del GR a la secuencia GREc. La interferencia producida por la co-estimulación de Dex y 8Br-AMPc puede implicar la formación de heterodímeros que desestabilizan la unión a CRE ó a GREc.

Estrategia Experimental

Como se explicó en la introducción, el GR puede afectar la transcripción uniéndose o no al DNA. Para poder determinar la manera en la que el GR esta participando en esta interferencia en la respuesta estimuladora de CREB-P, se consiguieron varios vectores que expresan al GR conteniendo diversas mutaciones. El vector p6RGR-wt expresa el receptor de glucocorticoides silvestre de rata (donado por el Dr. Paul Albert). El p6RGR-L501P (donado por el Dr. Paul Albert) expresa al receptor de glucocorticoides de rata con un cambio de leucina por prolina en la región 501 de la secuencia lineal de aminoácidos, modificando uno de los dos dedos de zinc, lo cual daña el dominio de unión a DNA más no debilita su interacción con otras proteínas (Xiao-Ming Ou *et al.*, 2000). El p6RGR-triple (GRtm) (donado por el Dr. Yamamoto) expresa al receptor de glucocorticoides con una triple mutación en los sitios T171A/S224A/S246A en el dominio N-terminal, éstas mutaciones están en sitios importantes de fosforilación por lo que, imposibilitan la dimerización del receptor de glucocorticoides con otros factores de transcripción como c-fos y c-jun pero no impiden la unión al DNA (Shena *et al.*, 1989).

La transfección de células hipotalámicas con el gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor de TRH (-776/+85) y el GR silvestre, el GR deficiente a la unión al DNA (GR L501P) o el GR con una triple mutación que impide la interacción a heterodímeros y a coactivadores permitirá determinar el mecanismo por el cual GR interacciona en el promotor de TRH, ya sea uniéndose directamente al DNA o interaccionando con otras proteínas, ante el estímulo con ambas drogas. Las células hipotalámicas serán utilizadas al octavo día *in vitro*, tiempo al cual se observan bajas concentraciones de GR endógeno (A. Cote, no publicado).



Materiales y Métodos.

Cultivo primario de células fetales hipotalámicas.

Ratas hembras vírgenes de la variedad Wistar en periodo fértil (proestro) fueron puestas en presencia de un macho durante toda la noche. Al día siguiente, se le consideró el primer día de gestación. Al día 17 de gestación las ratas fueron anestesiadas vía intraperitoneal (ip) con pentobarbital sódico (33mg/Kg) (Laboratorios Aranda). Los fetos fueron retirados uno a uno y el hipotálamo disectado bajo microscopio estereoscópico (Olympus), tomando como referencias anatómicas la parte posterior del quiasma óptico, los surcos laterales y la parte anterior de los cuerpos mamilares; los hipotálamos fueron mantenidos en solución Hank's (apéndice A). Posteriormente, los hipotálamos (3/ml) fueron enzimáticamente dispersados con agitación por 15min a 37°C en una solución de tripsina tipo III/DNasa tipo I, 0.25mg/ml y 0.28mg/ml, respectivamente. La digestión se detuvo con 200µl de suero fetal bovino (FBS) (Gibco BRL) y 200 µl de DNasa tipo I, por cada 2ml de la suspensión. Las células fueron concentradas en el fondo del tubo por centrifugación (1200rpm) (Beckman TJ6) durante 5 min a temperatura ambiente (TA), el botón celular se resuspendió utilizando 100 µl, por hipotálamo, de medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado (S-DMEM) con 10% de FBS, glucosa 0.25% (Sigma), glutamina 2mM (Sigma), insulina 4 µg/ml. (sigma), Vitaminas (1X, Gibco BRL) esterilizado por filtración a 0.22 µm (Millipore). La suspensión celular se dispersó mecánicamente con 3 pipetas Pasteur de diferentes diámetros. Haciendo pasar el tejido aproximadamente en diez ocasiones por pipeta. Una vez disgregado el tejido, éste se centrifugó en las mismas condiciones anteriormente mencionadas y se desechó el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en 5ml de S-DMEM por cada 1-15 hipotálamos colectados o en 10ml para cantidades mayores a 15 hipotálamos.

Se tomaron 15 µl de la suspensión celular para valorar la viabilidad y el rendimiento en una cámara de conteo (hemocitómetro) Nneubawer (Hausser Scientific) mezclándola con 15 µl del colorante azul de tripano (apéndice C) (incubación 2min). Las células muertas son permeables al colorante y se tiñen de color azul.

El conteo se realizó en un microscopio óptico (Nikon SE) con un objetivo 40X. Para determinar el número de células vivas/ µl, se tomó en cuenta el total de células detectadas en dos cuadrantes. El cálculo se realizó de la forma siguiente:

$$\frac{\# \text{ células vivas} \times \text{factor de dilución} \times K}{\# \text{ cuadros contados de } 0.005\text{mm}} = \# \text{ células} / \mu\text{l}$$

cuadros contados de 0.005mm

En donde:

K= 4000

Factor de dilución = 2

cuadros = 800

El total de células en la suspensión se determinó obteniendo el resultado del producto entre el valor de la fórmula 1 y los μ l totales de la suspensión:

(# células/ μ l) (μ l totales en suspensión) = # Total de células

Se utilizaron platos de cultivo estériles de 35mm (Corning) precubiertos con una capa de poli-D-lisina (sigma) (apéndice D) durante tres horas a 37°C y lavados con solución Hank's. La densidad celular utilizada fue de 2.7×10^6 células/plato. El volumen necesario para alcanzar esa densidad a partir de la suspensión total se obtuvo por regla de tres. El volumen final de medio S-DMEM por plato fue de 2ml. Los platos se mantuvieron en condiciones de humedad con 7% de CO₂ a 37°C en una incubadora (Revco-Ultima). El cultivo se mantuvo en dichas condiciones por 8 días. Al cuarto día de cultivo (4DIV) se agregó a cada plato 5 μ l de citosina β -D-arabinofuranósida (ARAC) (sigma) (10 μ M) para inhibir la proliferación de células gliales. A 6DIV se efectuó la transfección.

Purificación de los Plásmidos.

Para la purificación de los plásmidos se transformaron células DH5 α (*E.coli*) con los plásmidos TRH-luc (donado por Dr. Balkan), RSV-Bgal (donado por Dr. Pedraza), pUC18, p6RGR-wt (donado por Dr. Paul R. Albert), p6RGR-L501P (donado por el Dr. Paul R. Albert), p6RGRtm (donado por el Dr. Yamamoto) (Fig. 10) cada uno de estos por separado. La purificación se realizó con columnas Mega/Giga (Qiagen, Plasmid Purification Handbook). Los vectores fueron resuspendidos en agua bidestilada estéril y almacenados en alícuotas a -20°C hasta su uso.

Características de los Plásmidos.

El pNASS-TRH-luc permite la expresión de la luciferasa bajo el control del promotor de TRH y es resistente a ampicilina (Balkan *et al.*, 1998) (Fig. 6). El plásmido RSV-Bgal permite la expresión de β -Galactosidasa bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous, es resistente a ampicilina y se utiliza como control interno de transfección (An G. *et al.*, 1982) (Fig. 6).

El vector p6RGR-wt deriva del pSP65 y expresa el receptor de glucocorticoides silvestre de rata. El p6RGR-L501P expresa al receptor de glucocorticoides de rata con un cambio de leucina por prolina en la región 501 de la secuencia lineal de aminoácidos, modificando uno de los dos dedos de zinc, lo cual daña el dominio de unión a DNA más no debilita su interacción con otras

proteínas (Xiao-Ming Ou *et al.*, 2000). El p6RGR-triple expresa al receptor de glucocorticoides con una triple mutación en los sitios T171A/S224A/S246A presentes en el dominio N-terminal, éstas mutaciones caen fuera del dominio de unión a DNA y son sitios importantes de fosforilación por lo que, imposibilitan la dimerización del receptor de glucocorticoides con otros factores de transcripción como c-fos y c-jun (Shena *et al.*, 1989). Los tres últimos vectores son resistentes a ampicilina.

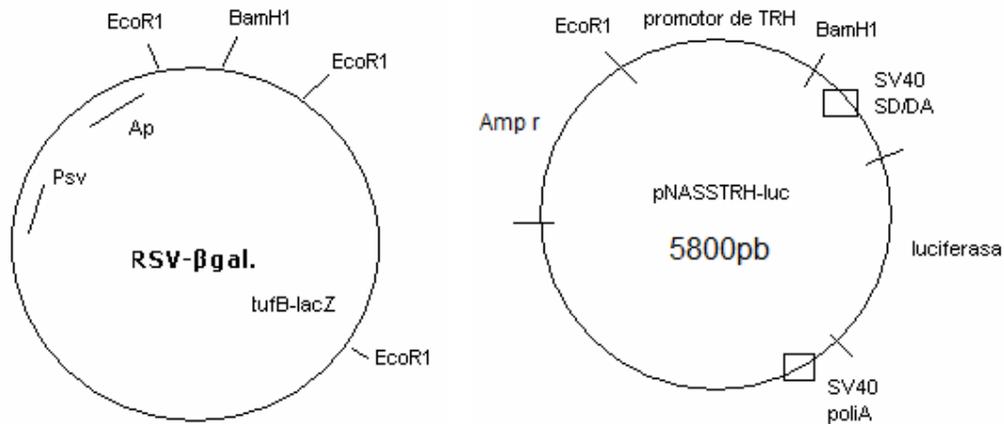


Figura 6. Representación gráfica de los vectores utilizados como vectores reporteros. Se muestra para cada caso algunos de los sitios de corte por enzimas de restricción y el gen de resistencia ampicilina (Amp^r o Ap). RSV-βgal es el control interno de transfección, pNASSTRH-luc es el plásmido que contiene la secuencia del gen reportero luciferasa bajo el control del promotor de TRH. (An G. *et al.*, 1982; Balkan W. *et al.*, 1998).

Transfección de cultivos primarios hipotalámicos.

Ha sido demostrado previamente que el uso de polietilenimina (PEI) incrementa la eficiencia de transfección en cultivos primarios de células endoteliales de cerebro de rata y neuronas de embrión de pollo debido principalmente a su naturaleza química rica en nitrógeno en forma de grupos amino, cargado positivamente que se asocia a los fosfatos con carga negativa del DNA (Guerra-Crespo *et al.*, 2003). En base a esto, los ensayos de transfección descritos en este trabajo se realizaron en presencia de PEI. De acuerdo con el protocolo previamente descrito en Guerra-Crespo *et al.*, 2003. Se utilizó una concentración de iones H⁺ (pH) de 6.9 la cual regula la condensación del DNA por la presencia de policationes. La relación PEI/DNA utilizada fue de 8:8.1. De tal manera que para realizar los ensayos de transfección se procedió de la siguiente manera:

A los 6DIV se prepararon por separado S-DMEM con 10% de FBS y S-DMEM sin FBS, ambos esterilizados por filtración. A parte, se pesaron 8.5mg de PEI (FLUKA chemicals) en una balanza

analítica y se disolvieron con 9.5ml de agua MiliQ esterilizada por autoclave. La solución se mezcló por agitación magnética y el pH se ajustó a 6.9 utilizando HCl 0.2N medido con potenciómetro (Beckman Selection 2000) de electrodo externo. Posteriormente, se aforó a 10ml volumen final con el agua mencionada y se esterilizó por filtración con un filtro de 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore).

Como vectores reporteros se transfectaron 2 μg del vector pNAss-TRH-Luc y 2 μg del vector RSV-Bgal (control de transfección) se mezclaron con NaCl (125mM final) y agua estéril hasta alcanzar un volumen final de 50 μl . En otro tubo se mezclaron 35 μl de la solución PEI (10mM), 1.5 μl de NaCl (150mM) y 13.5 μl de agua estéril (volumen final, 50 μl). Ambos tubos se agitaron con un Vórtex y se incubaron por separado a TA durante 10min. Posterior a ello, la mezcla PEI-NaCl-agua se agregó a la mezcla DNA-NaCl-agua (no al contrario); se agitaron con un Vórtex e incubaron por 20min a TA. En el transcurso de la incubación, se retiró todo el medio de cultivo de los platos y se lavaron las células con 1ml de S-DMEM sin suero. Se dejaron después con 1ml PEI/DNA (100 μl), ésta se llevó a un volumen final de 1ml, con S-DMEM sin suero. Dicha mezcla se agregó a cada uno de los platos de cultivo. Los platos se incubaron durante dos horas en las condiciones antes descritas, monitoreando la morfología celular a la primera hora por microscopía en contraste de fases, con la finalidad de detectar efectos tóxicos. Finalizado este tiempo, la mezcla de transfección se retiró de los platos de cultivo, sustituyéndola por 2ml de S-DMEM fresco con 10% de FBS. Las células se incubaron por 48hrs más. A los 8DIV el cultivo se estimuló con 8Br-AMPC 1mM (Sigma) disuelto en PBS (ver apéndice) y DEX 10^{-8} M disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) (< 0.05% concentración final). Las drogas fueron agregadas solas o en combinación. Las células se incubaron durante tres horas.

Tratamiento y cosecha.

Transcurrido el tiempo de incubación, el medio se retiró y las células se lavaron dos veces con 1ml de PBS. Se utilizaron 250 μl del buffer de lisis celular para cosechar las células (Promega Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity). Los tubos se colocaron en hielo y se agitaron intensamente en un vórtex durante 10 seg. Para concentrar el debris y los restos celulares, los tubos se sometieron a centrifugación a 13500rpm durante 2 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante (extracto celular) se hicieron alícuotas de 50 μl y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Determinación de la concentración de proteínas.

La cantidad de proteína en cada lisado se determinó con el método descrito (Bradford M. M., 1976). Brevemente, para cada ensayo se realizó una curva estándar con concentraciones

ascendentes a partir de un stock de 0.2mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma A-7906) mezclando un volumen constante de reactivo de ensayo de proteína (Bradford) (BioRad Labs.) (Tabla 1). Después de esperar 10 min a TA, se determinó la absorbancia a 595nm.

BSA (μl)	H2O (μl)	Bradford (μl)	Concentración final BSA
2.5	797.5	200	0.5
5	795	200	1
10	790	200	2
20	780	200	4
30	770	200	6
40	760	200	8
50	750	200	10
60	740	200	12
70	730	200	14
80	720	200	16
90	710	200	18
100	700	200	20

Tabla 1. Curva estándar del ensayo de proteína. Para cada caso se preparó un duplicado en tubos de vidrio 12X 75mm incubando a TA durante 10min previo a medir la absorbancia a $\lambda = 595\text{nm}$. Los valores fueron determinados contra un blanco que contenía 2.5 μl de buffer de lisis celular como sustituto de BSA.

Los valores expresados en unidades de concentración (mg/ml) de la curva estándar se usaron para extrapolar las concentraciones de las muestras. El análisis de las muestras se realizó por duplicado con 8μl de cada uno de los extractos, 200 μl de reactivo Bradford el resto en un volumen total de 1000μl de agua bidestilada estéril.

Ensayo de la actividad de luciferasa

La enzima luciferasa que procede de la luciérnaga *Photinus pyralis* cataliza la reacción (Fig. 7)

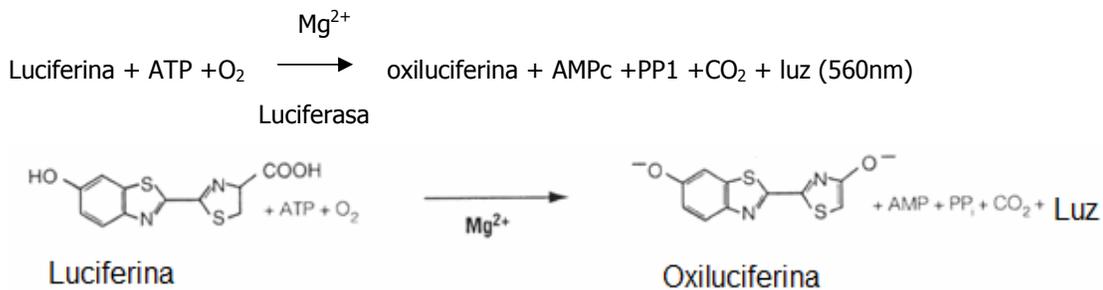


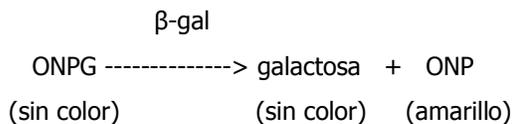
Figura 7. Reacción de bioluminiscencia catalizada por la luciferasa de luciérnaga.

El exceso de ATP en una solución que contenga los otros reactivos y la enzima bajo condiciones estándar produce un pico de luz que es proporcional a la actividad de la luciferasa.

Para medir la actividad de luciferasa se utilizó un Luminómetro (Analytical Luminescence Laboratory Monolight 2010) junto con la luciferina (Promega Luciferasa Assay Systems E1501) depositando 25µg de extracto celular (por duplicado) en los tubos de ensayo del luminómetro y se midió la emisión de luz mediante la adición automática de 100µl de luciferina (20mM ATP, 10mM MgSO₄, 20mM Gly-Gly (glicil-glicina), 0.2mM luciferina) durante un periodo de 10seg a temperatura ambiente.

Ensayo de la actividad de β-galactosidasa.

Se preparó una solución buffer consistente de 1µl de solución 100X de Mg [MgCl₂ 0.1M; β-mercaptoetanol (sigma) 4.5M], 22µl de 1X ONPG [O-nitrofenil-β-galactopiranosida (Sigma N1127)], disuelto en 0.1M de fosfato de sodio (4mg/ml); 67µl de fosfato de sodio 0.1M (pH 7.5) (41ml de Na₂HPO₄ 0.2M, 9ml de NaH₂PO₄ 0.2M) y 50ml de agua bidestilada para cada reacción. El buffer de reacción se mezcló con 3µl de extracto celular por duplicado en tubo de plástico de 1.5ml. La reacción se incubó a 37°C hasta la aparición del color amarillo característico (Sambrook *et al.*, 1989). La densidad óptica se midió a λ = 405 nm en un lector de elisa. La producción de color por la β-galactosidasa tiene una cinética lenta (Jain V.K., Magrath I.T., 1991). Para normalizar los ensayos de transfección se tomó como referencia las 72hrs. Para cada muestra el ensayo se realizó por duplicado. El color se produce cuando en la reacción el ONPG y la X-gal son hidrolizados por la β-galactosidasa.



De tal manera que, aquellas cajas de cultivo que se hayan transfectado de manera más eficiente, habrán producido mayor cantidad de la enzima β-galactosidasa y por lo tanto, podrán hidrolizar mayor cantidad de ONPG haciendo mas intenso el color de la reacción (Sambrook *et al.*, 1989).

Normalización de la actividad de luciferasa.

Debido a que la actividad de luciferasa puede variar independientemente de los tratamientos por el efecto de diferencias en el número de células en los platos o de variabilidad en la

eficiencia de transfección, los valores de unidades de luz fueron divididos por la cantidad de proteína en cada plato y por los valores obtenidos de la actividad de β -galactosidasa.

Presentación de los datos y análisis estadístico.

Los datos representan el promedio +/- el error estándar (SEM) de los valores obtenidos para cada ensayo de 6 cultivos representativos. El análisis estadístico se realizó con ANOVA con la prueba de comparación múltiple (LSD) de T de Student, $p < 0.05$.

RESULTADOS

Desarrollo morfológico de los cultivos.

La morfología de los cultivos se observó de forma general similar de un ensayo a otro (de acuerdo a lo reportado en Joseph-Bravo *et al.*, 2002; Cruz *et al.*, 1991). Las células muestran elongación de procesos a partir del 2DIV, llegando a confluencia desde el 3DIV. El efecto de AraC agregada al 4DIV impide que la glía y otros tipos celulares invadan el cultivo. Aquellos platos cuya morfología celular no fuese íntegra, que presentaran cúmulos de restos celulares flotando en el medio de cultivo, contaminación por microorganismos o baja densidad poblacional como resultado del cambio en el pH (color amarillo) del medio fueron descartados. Los efectos de la transfección fueron también evaluados y, los platos cuya morfología no fue satisfactoria durante las 48hrs siguientes a la transfección, o que no resistieron los cambios de microambiente (muriendo aproximadamente el 80% de su población celular), fueron descartadas del análisis.

Contenido de proteína

Como resultado de la transfección puede ocurrir daño tisular y un parámetro adicional fue la cuantificación de proteína total. El contenido de proteína total obtenido en los cultivos fue muy similar en todos los tratamientos presentando un rango entre 0.60 y 0.98 ug/ul (Fig. 8). Los cultivos que presentaron algún tipo de daño significativo durante el tratamiento y, por lo tanto, presentaron concentraciones de proteína menores al rango mencionado fueron descartados del análisis.

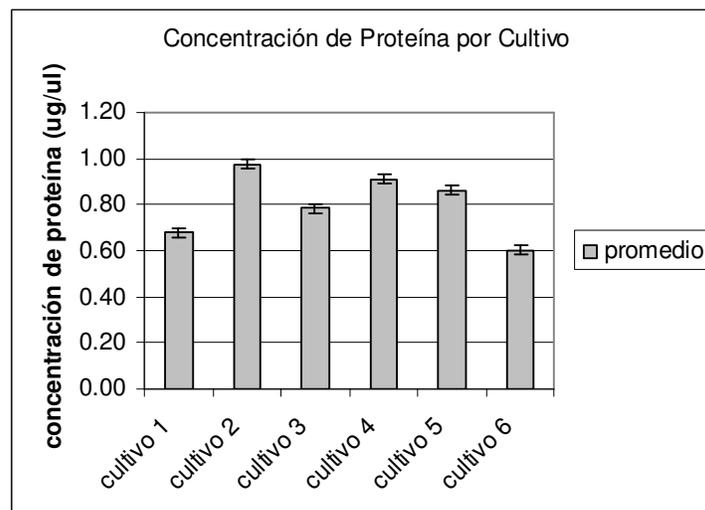


Figura 8. Concentración de proteína en cada cultivo. 8µl de extracto celular se utilizaron para medir la concentración proteína a 595nm por duplicado. Cada barra representa el promedio de todos los platos (tratados y control) de cada experimento independiente.

Los tratamientos no tuvieron ningún efecto sobre el contenido de proteína, según se puede apreciar en la figura 9.

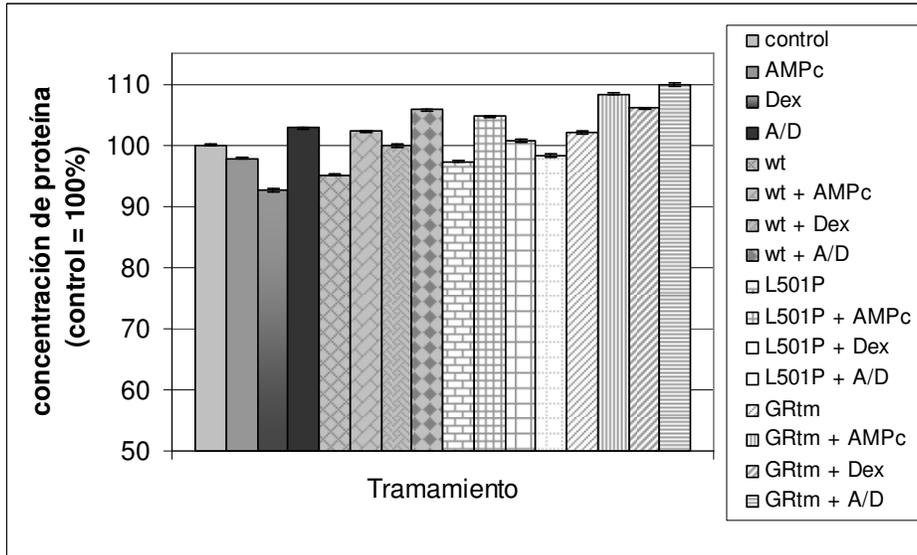


Figura 9. Concentración promedio de proteína en cada tratamiento. A los 6DIV las células se transfectaron mediante el polímero catiónico (PEI) con los vectores GRwt (wt), GRL501P (L501P) y GRtm. A los 8DIV los cultivos celulares se estimularon con los agentes 8Br-AMPc 1mM (AMPc), Dexametasona 10⁻⁸M (Dex) y las combinaciones Dex y AMPc (A/D).

Actividad específica de la β-Galactosidasa

El análisis de la eficiencia de transfección se valoró con la actividad de la β-galactosidasa, la cual muestra diferencias significativas de un cultivo a otro (Fig. 10). Sin embargo, esta variabilidad no representa un impedimento para las comparaciones intracultivo ya que cada se realiza la determinación en cada plato y se toma como control interno.

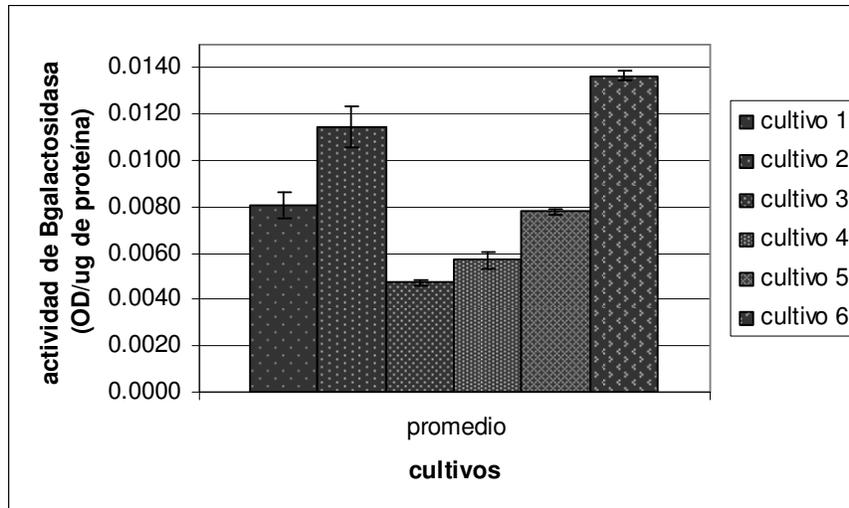


Figura 10. Actividad específica de la β -galactosidasa en cultivos independientes. Extractos de proteína celular (20 μ l) se utilizaron para cuantificar la actividad de la β -galactosidasa. Cada barra representa al promedio de todos los platos (tratados y control) de cada cultivo en forma independiente. (cultivo 1 n= 10, cultivo 2 n= 10, cultivo 3 n=17, cultivo 4 n=8, cultivo 5 n=8, cultivo 6 n=45).

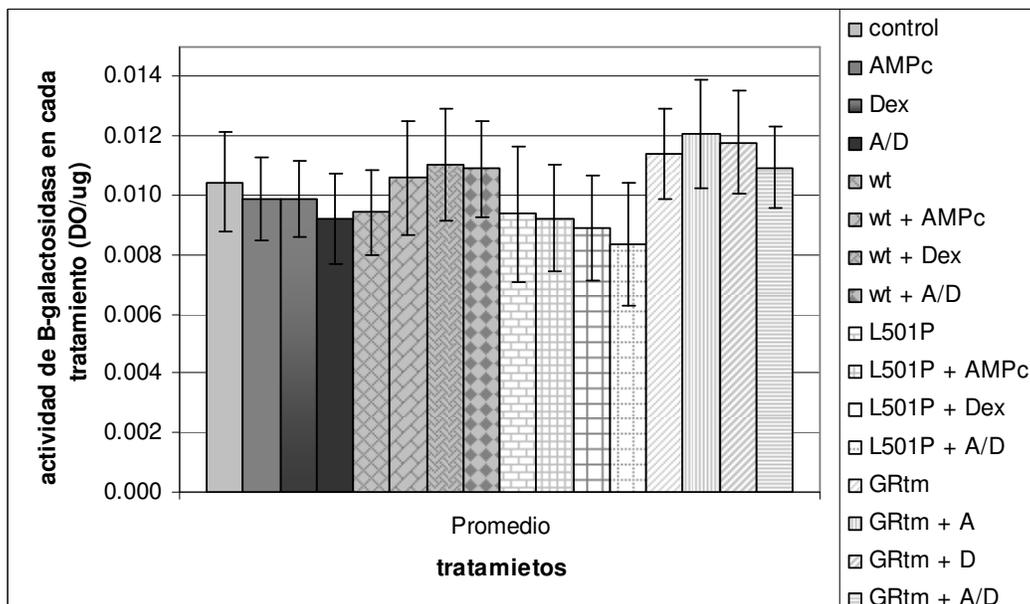


Figura 11. Efecto de los tratamientos sobre la actividad específica de la β -galactosidasa. A los 6DIV las células se transfectaron con el polímero catiónico (PEI) y se trataron a los 8DIV con los agentes ya descritos. Cada barra representa el promedio de cada tratamiento en forma independiente.

Los tratamientos no cambiaron significativamente la actividad de la β -galactosidasa, presentándose un rango entre 0.0086 y 0.012 (Fig. 11). Al normalizar los datos con la concentración de proteína y con los valores de b-gal éstos son comparables entre cada tratamiento y entre diferentes cultivos.

Expresión basal de los vectores control.

Las vectores de GR que fueron utilizados presentaron diferencias en la actividad del reportero por si mismos cuando no fueron estimulados. Observamos un aumento del 50% con respecto al control al transfectar el GRwt. El L501P fue el vector que mostró mayor actividad del reportero aumentando un 125% con respecto al control. El GRtm presentó una actividad similar al control aumentando tan sólo un 25% con respecto al control (Fig.12).

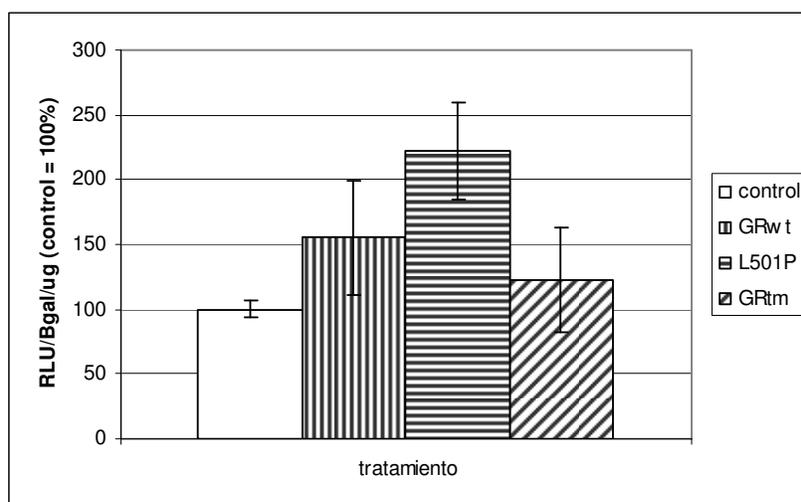


Figura 12. Actividad del reportero de los vectores control en cultivos de células hipotalámicas fetales de 6DIV que fueron transfectadas con los vectores reporteros (TRH-Luc y β -gal) junto con alguno de los vectores de GR. Se cuantificó la actividad de luciferasa, la cual se normalizó con los datos de β -gal y con los ug de proteína utilizados. Los resultados se expresan en porcentajes siendo el 100% los cultivos transfectados únicamente con vectores reporteros sin ninguna versión de GR (control). (n=7 control, n=6 GRwt, n=6 L501P, n=7 GRtm).

Efecto de los tratamientos en la actividad de luciferasa a los 8DIV.

En la figura 13 podemos observar que en el grupo de los controles hay un aumento significativo ($p < 0.0001$) de la actividad de luciferasa cuando el cultivo es estimulado con 8Br-AMPC a los 8DIV con respecto a su control, este aumento ($p < 0.0001$) lo observamos al incubar ambas drogas (AMPC/Dex) en el grupo de los controles, es decir, no se observa una interferencia. El ligero aumento no significativo cuando los controles a los 8DIV son estimulados con Dex se debe a que en el grupo control no se transfectó ninguna versión del receptor de glucocorticoides y en ésta etapa del cultivo (8DIV) no se detectan concentraciones de GR endógeno (datos de Cote-Vélez) por lo que la dexametasona no tiene receptor al cual unirse y por lo tanto no presenta estimulación con Dex y no interfiere en la estimulación del 8Br-AMPC.

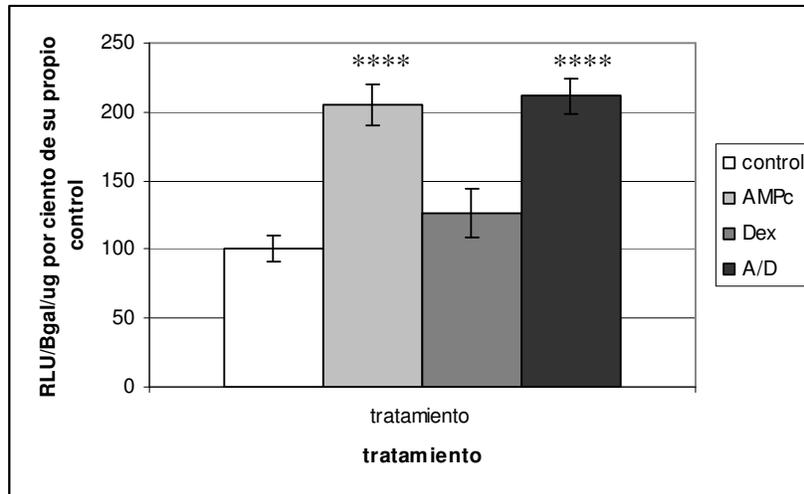


Figura 13. Efecto de los tratamientos sobre la actividad de luciferasa a los 8DIV. Cultivos de células hipotalámicas fetales de 6DIV fueron transfectadas con los vectores reporteros (TRH-Luc y β -gal). Las células fueron estimuladas a los 8DIV con 8Br-AMPC 1mM (AMPC), con Dexamatasona 10^{-8} M (Dex) o con ambas drogas (A/D). Se cuantificó la actividad de luciferasa, la cual se normalizó con los datos de β -gal y con los ug de proteína utilizados. Los resultados se expresan en porcentajes siendo el 100% los cultivos transfectados no estimulados (control). **** ($p < 0.0001$) con respecto a su propio control (control). (n=7 control, n=8 AMPC, n=8 Dex, n=8 A/D).

Al transfectar el cultivo con el GRwt observamos el mismo patrón descrito en Pérez- Martínez *et al.*, 1998 (Fig. 14), es decir, una estimulación con 8Br-AMPC, una estimulación con Dex y una disminución en la estimulación provocada por el 8Br-AMPC en la actividad de luciferasa con respecto al control cuando se incuban ambas drogas, lo que nos garantiza la funcionalidad del GRwt. Esta disminución en Wt + A/D es significativamente menor ($p < 0.0393$) con respecto al Wt + AMPC.

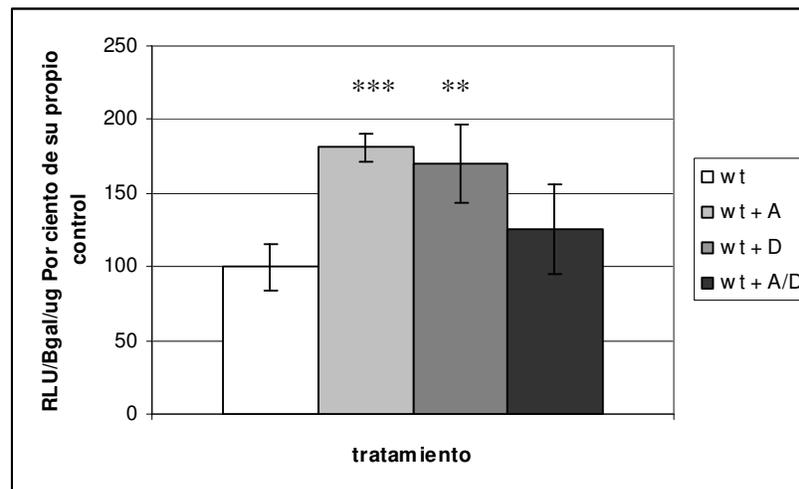


Figura 14. Efecto del GRwt sobre la actividad de luciferasa ante los estímulos con 8Br-AMPC 1mM, Dex 10^{-8} M ambas drogas a los 8DIV. Cultivos de células hipotalámicas fetales de 6DIV fueron transfectadas con los vectores reporteros (TRH-Luc y β -gal) junto con el GRwt. Las células fueron estimuladas a los 8DIV con 8Br-AMPC (wt + A), con Dex (wt + D) o con ambas drogas (wt + A/D). Se cuantificó la actividad de luciferasa, la cual se normalizó con los datos de β -gal y con los ug de proteína utilizados. Los resultados se expresan en porcentajes siendo el 100% los cultivos transfectados no estimulados (wt). ***($p < 0.0029$), **($p < 0.0064$) con respecto a su propio control (wt). (n=7 wt, n=6 wt+A, n=6 wt+D, n=7 wt+ A/D).

En el grupo de los platos transfectados con el GR deficiente en la unión al DNA, es decir, el grupo L501P, no hubo cambios significativos entre los diferentes estímulos (Fig. 15), incluyendo al L501P + AMPC contra el L501P. Al estimular el L501P con dexametasona no se observa aumento en la actividad de luciferasa es comparando al Wt + Dex, lo cual nos indica que la unión de GR a su elemento de respuesta es necesaria para la estimulación del gen de TRH.

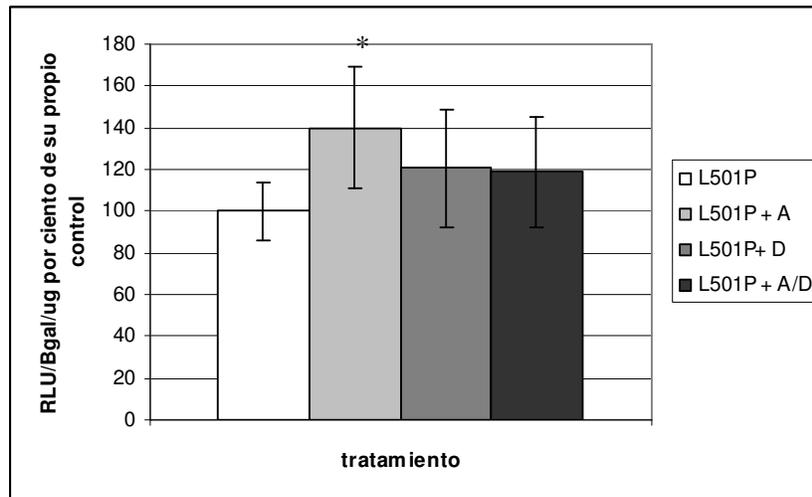


Figura 15. Efecto del L501P sobre la actividad de luciferasa ante los estímulos con 8Br-AMPC 1mM, Dex 10^{-8} M ambas drogas a los 8DIV. Cultivos de células hipotalámicas fetales de 6DIV fueron transfectadas con los vectores reporteros (TRH-Luc y β -gal) junto con el L501P. Las células fueron estimuladas a los 8DIV con 8Br-AMPC (L501P + A), con Dex (L501P + D) o con ambas drogas (L501P + A/D). Se cuantificó la actividad de luciferasa, la cual se normalizó con los datos de β -gal y con los ug de proteína utilizados. Los resultados se expresan en porcentajes siendo el 100% los cultivos transfectados no estimulados (L501P). *($p < 0.0393$) con respecto a su propio control (L501P). (n=6 L501P, n=6 L501P+A, n=5 L501P+D, n=6 L501P+AD).

En el grupo de los platos transfectados con el GR deficiente en la dimerización pero capaz de unirse al DNA (GRtm) podemos observar un aumento significativo ($p < 0.0266$) del GRtm + AMPC con respecto a su propio control (GRtm) (Fig. 16). Las platos que fueron transfectadas con el GRtm y estimuladas con Dex (GRtm + Dex) presentan una disminución significativa con respecto al wt + Dex ($p < 0.0237$). La incubación con Dex (GRtm + Dex) no mostró activación

pero la co-incubación con dex y AMPc resultó en una disminución significativa con respecto al wt + AMPc ($p < .0237$).

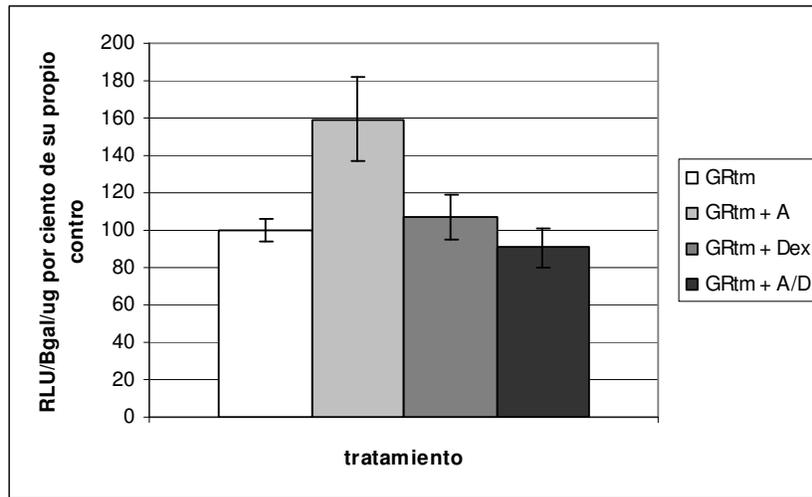


Figura 16. Efecto del GRtm sobre la actividad de luciferasa ante los estímulos con 8Br-AMPC 1mM, Dex 10^{-8} M o ambas a los 8DIV. Cultivos de células hipotalámicas fetales de 6DIV fueron transfectadas con los vectores reporteros (TRH-Luc y β -gal) junto con el GRtm. Las células fueron estimuladas a los 8DIV con 8Br-AMPC (GRtm + A), con Dex (GRtm + Dex) o con ambas drogas (GRtm + A/D). Se cuantificó la actividad de luciferasa, la cual se normalizó con los datos de β -gal y con los ug de proteína utilizados. Los resultados se expresan en porcentajes siendo el 100% los cultivos transfectados no estimulados (GRtm). **** ($p < 0.0001$), *** ($p < 0.0029$), ** ($p < 0.0064$), * ($p < 0.0393$) con respecto a su propio control (GRtm). (n=7 GRtm, n=5 GRtm+A, n=5 GRtm+Dex, n=6 GRtm+A/D)

Discusión

La regulación neuroendocrina de la síntesis de TRH es de naturaleza compleja y dinámica. Los experimentos *in vivo* muestran que en respuesta a un estímulo fisiológico como la exposición al frío o la succión incrementan en forma rápida y transitoria los niveles del RNAm de TRH. Esto ocurre a los 30-60 minutos de exposición, independientemente de que las ratas sigan en un ambiente de 4-6°C, a las 2h los niveles se normalizan (Uribe et al., 1993). La dinámica de la interacción entre distintas vías intracelulares, activadas por diferentes efectores neuronales u hormonales, resulta relevante para explicar la naturaleza transitoria de los cambios en la biosíntesis de TRH en condiciones *in vivo*. Este tipo de información sustenta una regulación muy fina en la cinética de la respuesta cuando se activan los factores de transcripción, los cuáles deben encontrarse en forma precisa en el espacio y el tiempo, explicando así cómo los factores ambientales, tales como el estrés, pueden afectar la respuesta metabólica. Las hormonas adrenales y tiroideas son los principales factores catabólicos que regulan el metabolismo basal. El aumento transitorio de cortisol incrementa la concentración de glucosa en sangre; el nombre genérico de glucocorticoides se debe a su efecto en la generación inmediata de glucosa que permite al organismo contender con el reto del estrés. La adrenalina liberada en respuesta a la activación del sistema simpático activa la vía de la glucólisis de los músculos, la movilización de los ácidos grasos del tejido adiposo y la termogénesis.

Las hormonas como los corticoesteroides afectan el eje tiroideo en diferentes niveles, incluyendo la biosíntesis del TRH. Los eventos rápidos en la biosíntesis del TRH pueden deberse a interacciones a nivel transcripcional, traduccional o postraduccionales. El significado biológico de la interacción entre la vía de PKA y la de glucocorticoides sobre la expresión del TRH explica en parte, el efecto deletéreo del estrés sobre el eje tiroideo. El conjunto de los resultados descritos en antecedentes apuntan por una interacción a nivel de la transcripción.

A nivel transcripcional, el mecanismo por el cual los glucocorticoides incrementan rápidamente los niveles de RNAm de TRH en células de cultivo primario pueden deberse a un efecto directo de GR en el GRE. En promotores en los cuales se encuentra sólo un medio sitio de GRE, se postula que GR actúa formando un heterodímero que estabiliza la unión. Como se mencionó en la introducción, el promotor de TRH presenta un medio sitio GRE, flanqueado, en la cadena complementaria, por dos secuencias similares al elemento de respuesta AP-1; este tipo de arreglo se ha observado en CRH y otros genes y se denomina GRE compuesto (Miner & Yamamoto 1992, Harrison *et al.* 1995, Malkoski & Dorin 1999). Los resultados obtenidos con EMSA sugirieron que al medio sitio GRE se une el heterodímero GR-Jun (Cote-Velez *et al.*, 2005). El GRE compuesto de TRH (-219pb/-197pb) responde a la estimulación con Dex, pero también con 8Br-AMPC y se observa interferencia en la unión con proteínas nucleares obtenidas de células co-estimuladas con ambas drogas (Cote-Vélez *et al.* 2005). De manera similar, la

unión a CRE se obtiene con extractos de células incubadas con 8Br-cAMP y disminuye con aquéllos incubados también con Dex. Tenemos por tanto una interferencia mutua a ambos sitios que pudiera explicarse mediante una interacción de GR y CREB-P activados que debilitan la unión a cada uno de los sitios. Sin embargo, hay pocos reportes que apoyen esta posibilidad con excepción de la de Stauber que propone una interferencia mutua cruzada (Stauber C *et al.*, 1992).

Podría tratarse de mecanismos independientes actuando sobre GRE ó CRE. El sitio CRE y el TRE (que une AP-1) tienen cierta homología por lo que tanto CREB-P como AP-1 pueden unirse a CRE ó TRE (Feng *et al.*, 1994, Satoh *et al.*, 1996) Además, los efectos de los glucocorticoides pueden estar mediados por Jun y Fos (Shule *et al.*, 1990). La interacción entre el sistema de GR y la vía de señalamiento de Fos/Jun puede ocurrir a través de una interferencia transcripcional (Jonat *et al.*, 1990; Yang-Yen *et al.*, 1990). Incluso, Jun y Fos pueden modular de manera diferencial [positivamente (Jun/Jun) o negativamente (Fos/Jun)] la actividad de GR en GRE (Diamond *et al.*, 1990).

A partir del hecho de que el gen de TRH tiene secuencias responsivas para GR, CREB-P y AP-1, podemos suponer dos modelos de interacción. El primero, la competencia por la unión específica a los sitios en el DNA entre los factores de transcripción CREB-P, AP1, y GR. La región 5' del gen de TRH contiene elementos de DNA que pueden unir tanto a CREB-P como a AP-1. Segundo, la inhibición de los niveles de TRH pudiera estar regulada mediante interacciones proteína-proteína entre CREB-P y AP-1. GR interactúa con AP-1 (Diamond *et al.*, 1990; Vig *et al.*, 1994) y con miembros de la familia CREB/ ATF (Habener, J.F. 1990) resultando en una regulación positiva o negativa de genes específicos (Schule & Evans, 1991).

El propósito de este trabajo fue el de determinar si la capacidad de unión de GR al DNA era indispensable cuando ocurre la interferencia del efecto de AMPc, ó si era suficiente contar con los sitios de interacción con otras proteínas (coactivadores, hetero u homodímeros, etc). Para ello utilizamos 3 distintos vectores: el GRwt (wild type) que codifica para el GR intacto. Con éste, comprobamos la efectividad del GRwt cuando no hay presencia de GR endógeno en el cultivo, ya que igualamos el efecto de los tratamientos previamente reportado en cultivos maduros (Pérez-Martínez *et al.*, 1998) ó en células transfectadas (Cote-Velez *et al.*, 2005).

El fragmento de 150 aminoácidos del GR de rata, que va desde el aminoácido 407 al aminoácido 556, es suficiente para la unión a GRE (Rusconi and Yamamoto 1987), la localización nuclear (Picard y Yamamoto 1987), el potenciamiento transcripcional (Miesfeld et al., 1987) y para la represión transcripcional (Miller et al., 1985). Este segmento (407-556) contiene dos dedos de zinc coordinados por 4 cisteínas que es esencial para la unión a DNA. La mutación L501P se localiza en uno de éstos dedos de zinc. Utilizando esta mutación de GR no

observamos el efecto estimulador de Dex, pero tampoco el esperado por la activación por AMPc que, en teoría, debía permitir al CREB-P actuar sobre CRE. Curiosamente, comparando la transcripción basal obtenida con cada uno de los 3 GR, el L501P fue el que mostró la más alta pero, al activar con 8Br-AMPc sólo se obtuvo una tendencia, comparada al transfectado sin estimulación. Esto podría sugerir que el GR incapaz de unirse al DNA, pero capaz de formar interacciones con otras proteínas, logra interferir con CREB-P ó AP-1 evitando su acción. Será necesario utilizar nuevas estrategias para corroborar esta posibilidad, por ejemplo, transfectar células de líneas celulares, con concentraciones variables de CREB-P y L501P y evaluar la posible interacción entre ellos ya que el exceso de L501P contra el CREB-P endógeno pudiera opacar cualquier efecto del CREB-P aún si la interacción fuese débil. Sin embargo, hay que considerar que Shena *et al.*, 1989 realizaron mutaciones azarosas en un segmento del receptor responsable de la unión a DNA y de la regulación transcripcional analizando los defectos del receptor en levaduras. Las mutaciones se hicieron en un rango de 66aa que incluye a los dos anillos de zinc; en general los fenotipos fueron similares en levaduras y en células animales. Las mutantes defectuosas para la unión a DNA fallaron en potenciar o reprimir la transcripción y, muchas mutaciones en el segundo dedo de zinc potenciaban selectivamente. Ellos sugieren que estas mutantes denominadas "control positivo" pueden alterar los contactos proteína-proteína con los coactivadores requeridos para la activación transcripcional (Shena *et al.*, 1989). Las mutaciones en el GRtm (T171A/S224A/S246A) se localizan fuera de ésta región por lo que sería necesario trabajar con mutaciones en el segundo dedo de zinc las cuales podrían ser las implicadas en nuestra interferencia.

Los resultados obtenidos con la triple mutante (GRtm), que puede unirse al DNA pero no interactuar con otras proteínas, mostraron una activación con 8Br-AMPc y una interferencia de ésta con Dex. La falta de estimulación con Dex es fácilmente explicable por no poder unirse GRtm a los coactivadores requeridos en la transcripción. En este caso pareciera entonces que GRtm se une a GRE y no activa, pero también interfiere con la acción de CREB-P. La única explicación que tenemos hasta el momento es que pudiera estar reconociendo un sitio cercano a CRE-2 (-101pb/-94pb) denominado GRE like invertido CCCCTGT localizado en -89pb/-83pb y que en los ensayos de "foot-printing" se ha podido observar una protección de ésta zona al estimularse con Dex la cual también se pierde al ponerse en contacto con proteínas de células que se estimularon con ambas drogas.

Conclusiones:

La expresión del reportero en cada transfección nos muestra que:

- a) Al transfectar las células de cultivo primario hipotalámico con los vectores reporteros TRH-luc y RSV-Bgal a los 6DIV y estimularlas a los 8DIV con 8Br-AMPC y Dex no se observa una interferencia de Dex al efecto estimulador del 8Br-AMPC, corroborándose los datos de Cote-Vélez en donde las bajas concentraciones de GR endógeno a los 8DIV no permiten observar la interferencia.
- b) Utilizando los datos de los controles en donde no se observa esta interferencia debido a las bajas concentraciones de GR endógeno pudimos comprobar la efectividad del GRwt en nuestro modelo ya que al transfectarlo fue posible observar la interferencia de Dex al efecto estimulador del 8Br-AMPC.
- c) Los resultados obtenidos con las versiones del receptor de glucocorticoides (GR L501P y GRtm) no fueron muy claros pero sugieren que sí puede existir una interacción proteica entre GR y CREB-P que interfiere con el efecto estimulador de CREB-P y, que será necesario estudiar las secuencias aledañas a CRE para definir si existe la posibilidad de que GR interfiera en ese sitio.
- d) Será necesario trabajar con otras mutaciones en el GR para poder identificar los sitios importantes en el GR implicados en esta interferencia así como diseñar mutaciones en el promotor que permitan dilucidar la importancia de los sitios GRE.

Glosario

- 8Br-AMPC:** 8-bromo –adenosin-monofosfato cíclico.
- AMPC:** 3´5´-adenosin-monofosfato-cíclico
- AP-1:** Proteína activadora 1
- ARA-C:** 1-β-D-arabinofuranosil citosina.
- BSA:** Albúmina sérica bovina
- CAT:** Cloranfenicol amino transferasa
- CRE:** Elemento de respuesta a AMPc
- CREB:** Proteína de unión al elemento de respuesta AMPc
- CRH:** Hormona liberadora de corticotropina
- dB-AMPC:** Dibutiril-adenosin-monofosfato-cíclico
- DEAE-dextran:** Dietil-amino etil dextran
- DEX:** dexametasona
- DIV:** días *in vitro*
- DMEM:** Dulbeccos Modified Eagle´s Medium
- DMSO:** Dimetil sulfóxido
- DNA:** Ácido Desoxiribonucleico
- EGF:** Factor de crecimiento epidermal
- EGFRE:** Elemento de respuesta al factor de crecimiento epidermal
- FBS:** Suero fetal bovino
- GC:** glucocorticoides
- GFP:** Proteína verde fluorescente
- GR:** receptor de glucocorticoides
- HGh:** Hormona de crecimiento humana.
- LUC:** luciferasa
- NPV:** Núcleo paraventricular
- NPY:** Neuropeptido Y
- ONPG:** orto-nitrofenil-β-galactosida
- PBS:** Solución buffer de fosfatos
- PC1-2:** Pro-hormona convertasa 1 y 2.
- PEI:** polietilenimina
- PKA:** Proteína cinasa A
- PKC:** Proteína cinasa C
- PPII:** Piroglutamil peptidasa II
- PpTRH:** Prepro-hormona liberadora de tirotropina
- PRL:** Prolactina
- RLU:** unidades relativas de luz.
- RNAm:** ácido ribonucleico mensajero
- RSV- β –Gal:** Virus del sarcoma de Rous-Beta galactosidasa
- RT-PCR:** Transcripción reversa- Reacción en cadena de la polimerasa.
- S-DMEM:** Dulbeccos Modified Eagle´s Médium Suplementado.
- SEAP:** Fosfatasa alcalina de placenta
- SNC:** sistema nervioso central
- SP1:** Proteína específica 1
- T₃ :** triyodotironina
- THRA y B:** Receptores de hormona tiroidea
- THRE:** Elemento de respuesta a hormona tiroidea
- TPA:** 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato
- TR:** Receptor de hormona tiroidea
- TRH:** Hormona liberadora tirotropina
- α –MSH:** Hormona estimulante de melanocitos.
- β –Gal:** Beta galactosidasa.

Apéndice

A) Preparación de 500 ml de solución Hank's.

1. Cloruro de sodio (NaCl) 4g
2. Cloruro de potasio (KCL) 0.2g
3. Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.2g
4. Fosfato de sodio (NaH₂PO₄) 0.045g
5. D-(+)- glucosa 0.50g
6. Mezclar y aforar con agua estéril a 500ml.

B) Preparación de 1000ml de PBS 1X

1. Cloruro de potasio (KCL) 0.20g
2. Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.195g
3. Cloruro de sodio (NaCl) 8.12g
4. Fosfato de sodio (NaH₂PO₄) 0.97g
5. Disolver y aforar con agua estéril a 1000 ml

C) Preparación de azul de tripano (10X)

Aproximadamente a 95ml de agua grado cultivo estéril adicionar:

1. Azul de tripano (Sigma T-0887) 0.4g
2. Cloruro de sodio (NaCl) 0.81g
3. Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.06g
4. Azida de sodio (VO15) 0.02g

Calentar a ebullición, esperar a que enfríe, ajustar el pH a 7.2 con HCl 1N.

Guardar a 4°C. Para tinción vital, diluir 1: 10 en PBS

D) Preparación de poli-D-lisina

A un frasco de 5mg agregar 1ml de agua estéril grado cultivo.

Agitar y hacer alícuotas de 150µl y 100 µl en tubos de 0.5 ml (Eppendorf).

Referencias

Akil H., Campeu S., Cullinan W.E., Lechan R.M., Toni R., Watson S. J., Moore R. Y., *Neuroendocrine Systems I: Overview of Thyroid and Adrenal Axes*. Chapter 43, en: *Fundamental Neuroscience*, 1999, Zigmond M.J., Bloom F.E., Roberts J. L., Landis S. C., Squire L. R., Academic Press, London UK. pp 1127-1136.

Akner G., Wikström A.C., Mossberg K., Sundqvist K.G., Gustafsson J.A. 1994. *Morphometric studies of the localization of the glucocorticoid receptor in mammalian cells and of glucocorticoid hormone-induced effects*. *J Histochem Cytochem*. May;42(5):645-57.

Alam J., Cook J.L. 1990, *Reporter Genes: Application to the Study of Mammalian Gene Transcription*. *Analytical Biochemistry*, 188: 245-54.

al-Daamluji S. 1993. *Adrenergic control of the secretion of anterior pituitary hormones*. *Billieres Clin Endocrinol Metab*. 7(2):355-92.

An G., Hidaka K., Siminovitch L. 1982. *Expression of the Bacterial β -galactosidase in Animal Cells*. *Molecular and Cellular Biology*. 2: 1628-32.

Angel P, Karin M. 1991. *The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation*. *Biochim Biophys Acta*. Dec 10;1072(2-3):129-57.

Arancibia S., Tapia-Arancibia, Assenmacher i., Astier H. 1983. *Direct evidence of short term cold induced TRH release in the eminence of unanesthetized rats*. *Neuroendocrinology* 64. 257-267.

Balkan W., Taviani M.A., Gkonos P.J., 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*, 139:252-59.

Bamberger C.M., Schulte H.M., Chrousos G.P. 1996. *Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids*. *Endocr Rev*. Jun;17(3):245-61

Bauer K., Schulz M. 1992. *Inactivation of the thyrotropin releasing hormone*. *Acta Med Austriaca*. 19 Suppl 1:79-82.

Bear M.F., Connors B.W. & Paradiso M.A. 2001. *Neuroscience: Exploring the Brain*. Segunda edicion. Eds. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.

Beverly M. K., Gilbert H. D. 1999. *Regulación Neuroendócrina*, en: *Principios de Medicina Interna*. Cap. 13, Sección 1, Vol. II, Edits. Fauci A.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Wilson J.D., Martin J.B., Kasper D. L., 14a. Edición, Edit. McGraw Hill, Madrid, España, pp 2241-44.

Boler J., Enzmann K., owsers C.Y., Schally A.V. 1969. *The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline-amide*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 37: 705-710.

Bradford M.M. 1976. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry. 72 248-254.

Brasier A.R., Tate J.E., Habener J.F. 1989. *Optimized use of the firefly luciferase assay as a reporter gene in mammalian cell lines*. Biotechniques. Nov-Dec;7(10):1116-22.

Broberger C. 2005. *Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks*. Journal of Internal Medicine: 258:301-327.

Bronstein I., Fortin J., Stanley P.E., Stewart G.S., Kricka L.J. 1994. *Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays*. Anal Biochem. Jun;219(2):169-81.

Bruhn T.O., Huang S.S., Vaslet, Ch., and Nillni, E.A. 1998. *Glucocorticoids modulate the biosynthesis and processing of prothyrotropin releasing-hormone (proTRH)*. Endocrine. Oct; 9(2):143-52.

Bruhn T.O., Rondeel J.M., Bolduc T.G., Jackson I.M. 1994. *Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. III. Stimulation by thyroid hormone: potentiation by glucocorticoids*. Endocrinology. Feb;134(2):826-30.

Burgus R., Dunn T., Desiderio D., Guillemin R. 1969. *Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d'origine ovine: mise en évidence par spectrometrie de masse de la sequence PCA-His-Pro-NH₂*. C.R: Acad. Sci. (Paris) 269: 1870-1873.

Cao J., O'Donnell D., Vu H., Payza K., Pou C., Godbout C., Jakob A., Pelletier M., Lemo P., Ahmad S., Walker P. 1998. *Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel subtype of rat thyrotropin-releasing hormone receptor*. J Bio Chem. Nov 27;273:32281-7

Carey M., Smale S.T., 2000. *Functional Assays for promoter Analysis*, cap. 5, en: *Transcriptional Regulation in Eukaryotes*. CSHL Press, pp 148-49.

Chang RC, Huang WY, Redding TW, Arimura A, Coy DH, Schally AV. 1980. Isolation and structure of several peptides from porcine hypothalamus. *Biochim Biophys Acta*. 21;625(2):266-73.

Charli J.L., Cruz C., Redondo J.L., Guerra C. y P. Joseph-Bravo. 1995. Homologous conditioned medium enhances expression of TRH in hypothalamic neurons in primary cultures. *Dev. Brain Res.* 89, 155-160.

Charli J.L., Joseph-Bravo P. 2006. El cerebro, la comunicación intracelular y los péptidos. 25 años del IBt.

Charli J.L., Vargas M.A., Cisneros M., de Gortari P., Baeza M.A., Jasso P., Bourdais J., Pérez L., Uribe R.M., Joseph-Bravo P. 1998. *TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II*. *Neurobiology (Bp)*. 6(1):45-57.

Cote-Vélez A., Pérez Martínez L., Díaz Gallardo M.Y., Pérez Monter C., Carreón Rodríguez A., Charli J.L., 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*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 177-197.

Covarrubias L., Uribe R.M., Méndez M., Charli J.L., Joseph-Bravo P. 1988. *Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels*. *Biochem Biophys Res Commun*. 151: 615-22.

Cruz C, Charli JL, Vargas MA, Joseph-Bravo P. 1991. *Neuronal localization of pyroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain*. *Neurochem.* May;56(5):1594-601.

Curtis, Barnes. 2004. *Biología*. Sexta edición. Ed. Panamericana.

Dahlman-Wright K., Wright A., Gustafsson J.A., Carlstedt-Duke J. 1991. *Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids*. *J Biol Chem*. Feb 15;266(5):3107-12.

Diamond MI, Miner JN, Yoshinaga SK, Yamamoto KR. 1990. *Transcription factor interactions: selectors of positive or negative regulation from a single DNA element*. *Science*. Sep 14;249(4974):1266-72.

Eckert R., Randall D., Augustine G. 1994. *Fisiología Animal mecanismos y adaptaciones*. Interamericana Mc-Graw-Hill. 3er edición.

Fekete C., Sarrar S., Lechan R. 2005. *Relative contribution of brainstem afferents to the cocaine and amphetamine regulated transcript (CART) innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN)*. Brain Research 1032 171-175.

Feng P., Li Q.L., Satoh T., Wilber J.F. 1994. *Ligand (T3) Dependent and Independent Effects of Thyrotropin Hormone Receptor upon Human TRH Gene Transcription in Neuroblastoma Cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 200: 171-77.

Freedman L.P., Luisi B.F., Korszun Z.R., Basavappa R., Sigler P.B., Yamamoto K.R. 1988. *The function and structure of the metal coordination sites within the glucocorticoid receptor DNA binding domain*. Nature. Aug 11; 334(6182):543-6.

Fuse Y., Polk D.H., Lam R.W., Fisher D.A. 1991. *Ontogeny of thyrotropin releasing hormone and precursor peptide in the rat*. Pediatr Res. Jul;30(1):28-33.

Garabedian M.J., Yamamoto K.R. 1992. *Molecular Biology of the Cell*, 3:1245-1257

Giguère V., Hollenberg S.M., Rosenfeld M.G., Evans R.M. 1986. *Functional domains of the human glucocorticoid receptor*. Cell. Aug 29;46(5):645-52.

Griffiths E.C., Kelly J.A., Klootwijk W., Visser T. J. 1980. *Enzymic Formation of TRH-OH from TRH by Rat Hypothalamus*, Molecular and Cellular Endocrinology, 18:59-67.

Gouilleux F. 1999. *Interactions between the glucocorticoid receptor and transcription factors* J Soc Biol.;193(4-5):369-73.

Guldenaar S. E. F., Veldkamp B., Onno B., Wiersinga W. M., Swaab D. F., Fliers E. 1996. *Thyrotropin Releasing Hormone Gene Expression in the Human Hypothalamus*, Brain Research, 743: 93-101.

Guerra-Crespo M., Charli J.L., Rosales-García V.H., Pedraza-Alva G., Pérez-Martínez L. 2003. *Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons*. J Neuroscience Methods. 127; 179-192.

Hai T., Hartman M.G. 2001. *The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis*. Gene. Jul 25;273(1):1-11.

Haisendeder D.J. Ortalano; Dalking A.C. Yasing M. Marshall J. (1992) *Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of polactin in the lacting rat*. Endocrinology 130: 29-2923.

Harris M., Aschkenasi C., Elias C.F., Chandrankunnel A., Nillni E.A., Bjørbaek C., Elmquist J.K., Flier J.S., Hollenberg A.N. 2001. *Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling*. J Clin Invest. Jan; 107(1):111-20

Harvey S. 1990. *Thyrotropin-releasing hormone: a growth hormone-releasing factor*. J Endocrinol. 125: 345-58.

Helmborg A., Auphan N., Caelles C., Karin M. 1995. *Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor*. EMBO J. Feb 1;14(3):452-60.

Hökfelt T., Lundberg J.M., Schultzberg M., Johansson O., Skirboll L., Anggård A., Fredholm B., Hamberger B., Pernow B., Rehfeld J., Goldstein M. 1980. *Cellular localization of peptides in neural structures*. Proc R Soc Lond B Biol Sci. Oct 29;210(1178):63-77.

Hollenberg S.M., Evans R.M. 1988. *Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor*. Cell. Dec 2;55(5):899-906.

Hollenberg S.M., Giguere V., Segui P., Evans R.M. 1987. *Colocalization of DNA-binding and transcriptional activation functions in the human glucocorticoid receptor*. Cell. Apr 10;49(1):39-46.

Hu L.M., Bodwell J., Hu J.M., Ortí E., Munck A. 1994. *Glucocorticoid receptors in ATP-depleted cells. Dephosphorylation, loss of hormone binding, HSP90 dissociation, and ATP-dependent cycling*. J Biol Chem. Mar 4;269(9):6571-7

Hutchison K.A., Dalman F.C., Hoeck W., Groner B., Pratt W.B. 1993. *Localization of the approximately 12 kDa M(r) discrepancy in gel migration of the mouse glucocorticoid receptor to the major phosphorylated cyanogen bromide fragment in the transactivating domain*. J Steroid Biochem Mol Biol. Dec;46(6):681-6.

Jackson I. M. D., Luo L. G., 1998. *Antidepressants Inhibit the Glucocorticoids Stimulation of Thyrotropin-Releasing Hormone Expression in Cultured Hypothalamic Neurons*, Journal of Investigative Medicine, 46: 470-74.

Jackson I.M. 1983. *Thyrotropin-Releasing Hormone TRH: Distribution in Mammalian Species and its functional significance*, en: *Thyrotropin-Releasing Hormone*, Edit Griffiths E.C., Bennett G.W., Raven Press, New York, pp 3-18.

Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato AC, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. 1990. *Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone*. Cell. Sep 21;62(6):1189-204.

Joseph-Bravo, Cote-Vélez y Pérez-Martínez L. Integration of neuroendocrine signals that regulate the activity of hypophysiotropic peptides. En: *Molecular Endocrinology* (Ed. Patricia Joseph-Bravo), Chapter 1. Research sign post, Kerala India. 2006

Joseph-Bravo P, Perez-Martinez L, Lezama L, Morales-Chapa C, Charli JL. 2002. *An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells*. Brain Res Brain Res Protoc. Apr;9(2):93-104

Joseph-Bravo P., Uribe R.M., Vargas M.A., Pérez-Martínez L., Zoeller T. and Charli J.L. 1998. *Multifactorial regulation of TRH metabolism*. In: *Special Issue "Modulating Mechanisms of Neuroendocrine Cell Activity"* of: Cellular and Molecular Neurobiology. 18, 229-245.

Kakucska I., Qi Y., Lechan R.M. 1995. *Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone*. Endocrinology. Jul;136(7):2793-4.

Karin M. 1995. *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem. Jul 14;270(28):16483-6

Kawasaki H., Springett G. M., Mochizuki N., Toki S., Nakaya M., Matsuda M., Housman D. E., Graybel A. M., 1998. *A Family of cAMP- Binding Proteins that Directly Activate Pap1*, Science, 282:2275-79.

König H., Ponta H., Rahmsdorf H.J., Herrlich P. 1992. *Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo.* EMBO J. Jun;11(6):2241-6.

Kutoh E., Strömstedt P.E., Poellinger L. 1992. *Functional interference between the ubiquitous and constitutive octamer transcription factor 1 (OTF-1) and the glucocorticoid receptor by direct protein-protein interaction involving the homeo subdomain of OTF-1.* Mol Cell Biol. Nov;12(11):4960-9

Lechan R.M., and Toni R. 1992. *Thyrotropin releasing hormone neuronal systems in the central nervous system.* In Nemeroff, C.B. (ed.) Neuroendocrinology, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 279-330.

Lechan R. M., Wu P., Jackson I.M., Wolf H., Cooperman S., Mandel G., Goodman R. H., 1986. *Thyrotropin Releasing Hormone Precursor: Characterization in Rat Brain,* Science, 231: 159-161.

Lee G.C., Yang I.M., Kim B.J., Woo J.T., Kim S.W., Kim J.W., Kim Y.S., Choi Y.K. 1996. *Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene.* Korean J Intern Med. Jun;11(2):138-44.

Lee S. L., Sevarino K., Roos B. A., Goodman R. H. 1988. *Characterization and expression of the Gene Encoding Rat Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) en: Thyrotropin Releasing Hormone,* Edit. Geoffrey Metcalf, Vol. 553, The New York Academy of Science, NY. pp 14-27.

Lee S. L., Stewart K., Goodman R. H. 1988. *Structure of the Gene Encoding Rat Thyrotropin Releasing Hormone,* Journal of Biological Chemistry, 263: 16604-609.

Légrádi G., Lechan R.M. 1999. *Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus.* Endocrinology. Aug;140(8):3643-52.

Loudes C., Barret A., Tixier-Vidal A., Faivre-Bauman A. 1989. *Thyroliberin (TRH) Biosynthesis by Hypothalamic cells in Serum-Free Medium Cultures,* Neurochemistry International, 4: 35-41.

Luo L.G., Bruhn T., Jackson I.M. 1995. *Glucocorticoids stimulate thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured hypothalamic neurons.* Endocrinology. Nov;136(11):4945-50.

Martin C.S., Wight P.A., Dobretsova A., Bronstein I. 1996. *Dual luminescence-based reporter gene assay for luciferase and beta-galactosidase.* Biotechniques. Sep;21(3):520-4.

- Mitsuma T., Nogimori T., Hirooka Y. 1987. *Effects of growth hormone-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone on the release of thyrotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro*. Exp Clin Endocrinol. 90:365-8.
- Méndez M., Joseph-Bravo P., Cisneros M., Vargas M. A., Charli J. L. 1987. *Regional Distribution of In Vitro Release of Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain*, Peptides, 8: 291-98.
- Murdoch G. H., Franco R., Evans R. M., Rosenfeld M. G. 1983. *Polypeptide Hormone Regulation of Gene Expression*, Journal of Biological Chemistry, 258: 15329-35.
- Muszynski M., Birnbaum R. S., Roos B.A., 1983. *Glucocorticoids Stimulate the Production of Preprocalcitonin-derived Secretory Peptides by a Rat Medullary Thyroid Carcinoma Cell Line*, Journal of Biological Chemistry, 258: 11678-11683.
- Nilni E.A., Friedman T.C., Todd R.B., Birch N.P., Loh Y.P., Jackson I.M. 1995. *Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1*. J Neurochem. Dec;65(6):2462-72.
- Oñate S.A., Tsai S.Y., Tsai M.J., O'Malley B.W. 1995. *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. Science. Nov 24;270(5240):1354-7
- Oshima H., Simons S.S. Jr. 1992. *Modulation of glucocorticoid Induction of Tyrosine Aminotransferase Gene Expression by Variations in Cell Density*, Endocrinology, 130: 2106-112.
- Paliogianni F., Ahuja S.S., Balow J.P., Balow J.E., Boumpas D.T. 1993. *Novel mechanism for inhibition of human T cells by glucocorticoids. Glucocorticoids inhibit signal transduction through IL-2 receptor*. J Immunol. Oct 15;151(8):4081-9.
- Pérez Martínez L., Carreón-Rodríguez A., González-Alzati Ma. E., Morales C., Charli J.L., Joseph-Bravo P., 1998, *Dexamethasone rapidly Regulates TRH mRNA Levels in Hypothalamic Cell Cultures: Interaction with the cAMP Pathway*, Neuroendocrinology, 68:345-54.
- Pérez Martínez L., Uribe R. M., Sánchez E., Carreón- Rodríguez A., Chávez L., Zacarias M., Joseph-Bravo P., Charli J. L. 1999. *Regulation of TRH Biosynthesis in the Paraventricular Nucleus of Rodent Hypothalamus*, Current Topics in Neurochemistry, 2: 79-87.
- Picard D., Yamamoto K.R. 1987. *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. EMBO J. Nov;6(11):3333-40.

Pratt WB. 1993. *The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor.* J Biol Chem. Oct 15; 268(29):21455-8.

Richter K., Kawashima E., Egger R., Kreil G. 1984. *Biosynthesis of Thyrotropin Releasing Hormone in the skin of Xenopus Laevis: Partial Sequence of the Precursor Deduced From Cloned cDNA,* EMBO Journal, 3: 617-21.

Rose S. 2005. *The Future of the Brain. The Promise and Perils of Tomorrow's Neuroscience.* Oxford University Press, Oxford.

Sambrook & Russell: *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2003. Cold Spring Harbor.

Satoh T, Yamada M, Iwasaki T, Mori M. 1996. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. J Biol Chem. Nov 1;271(44):27919-26.

Scheinman R.I., Gualberto A., Jewell C.M., Cidlowski J.A., Baldwin A.S. 1995. *Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF-kappa B by activated glucocorticoid receptors.* Mol Cell Biol. Feb;15(2):943-53

Schüle R, Rangarajan P, Kliewer S, Ransone LJ, Bolado J, Yang N, Verma IM, Evans RM. 1990. *Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor.* Cell. Sep 21;62(6):1217-26.

Segerson T.P., Kauer J., Wolfe H.C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I.M.D., Lechan R.M. 1987. *Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus.* Science. 238:78-80.

Shena M., Freedman L.P., Yamamoto KR. 1989. *Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities.* Genes Development, 3:11590-1601.

Squire L, Bloom E, McConnell S, Roberts J, Spitzer N, Zigmond M. 2003. *Fundamental Neuroscience.* Second Edition. Academic Press (USA).

Smith M.A., Makino S., Kim S.Y., Kvetnansky R. 1995. *Stress increases brain-derived neurotropic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary.* Endocrinology. 136:3743-50.

- Stocca G., Nistri A. 1996. *The neuropeptide thyrotropin-releasing-hormone modulates GABAergic synaptic transmission on pyramidal neurons of the rat hippocampal slice*. Peptides. 17:1197-202.
- Tavianini M.A., Gkonos P.J., Lampe T.H., Roos B.A. 1989. *Dexamethasone stimulates thyrotropin-releasing hormone production in a C cell line*. Mol Endocrinol. Apr;3(4):605-10.
- Thompson E.B., Medh R.D., Zhou F., Ayala-Torres S., Ansari N., Zhang W., Johnson B.H. 1999. *Glucocorticoids, oxysterols, and cAMP with glucocorticoids each cause apoptosis of CEM cells and suppress c-myc*. J Steroid Biochem Mol Biol. Apr-Jun;69(1-6):453-61
- Truss M., Bartsch J., Schelbert A., Haché R.J., Beato M. 1995. *Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo*. EMBO J. Apr 18;14(8):1737-51.
- Tsai M.J., O'Malley B.W. 1994. *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem.;63:451-86.
- Tsai S.Y., Carlstedt-Duke J., Weigel N.L., Dahlman K., Gustafsson J.A., Tsai M.J., O'Malley B.W. 1988. *Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation*. Cell. Oct 21;55(2):361-9
- Tsigo R. 2002. *The neuroendocrine system: organization and homeostatic role*. J Endocrinol Invest 7:35-47.
- Uribe R.M., Pasten J., Ponce G., Méndez M., Covarrubias L., Joseph-Bravo P., and Charli J.L. 1991. *Some events of TRH metabolism are regulated in lactating and cycling rats*. Neuroendocrinology. 54, 493-98.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. 1993. *Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus*. Neuroendocrinology. Jul;58(1):140-5.
- Vanderborne K., Roeles S.A., Darras V.M., Kuhn E.R., Van der Geyten S. 2005. *Cloning and hypothalamic distribution of the chicken thyrotropin-releasing hormone precursor cDNA*. J Endocrinol. 186:387-96.

Van Haasteren G.A., Linkels E., van Toor H., Looftwijk W., Kaptein E., de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. 1996. *Effects of long term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats.* J Endocrinol. 150: 169-78.

Verma I.M., Stevenson J.K., Schwarz E.M., Van Antwerp D., Miyamoto S. 1995. *Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation.* Genes Dev. Nov 15;9(22):2723-35.

Whitehead D., Carter D.A. 1997. *cAMP response element-binding protein phosphorylation and DNA binding activity are increased in the anterior pituitary gland following glucocorticoid depletion.* J Mol Endocrinol. Dec;19(3):291-7.

Wilber J.F., 1998. *The thyrotropin-releasing hormone gene: cloning, characterization and transcriptional regulation in the central nervous system, heart and testis.* Thyroid 8:897-901.

Xiao-Ming Ou, Storrington J.M., Kushwaha N., Albert P. 2000. *Heterodimerization of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptors at a Novel Negative Response Element of the 5-HT1A Receptor Gene.* J Biological Chemistry. 276;14299-14307.

Yamaguchi M., Iriuchijima T., Michimata T., Mori M., 1997. *Glucocorticoids affect the release of thyrotropin-releasing hormone from the rat hypothalamus.* Neuroendocrinology. 53: 423-27.

Yang-Yen H.F, Chambard J.C., Sun Y.L., Smeal T., Schmidt T.J., Drouin J., Karin M. 1990. *Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction.* Cell. Sep 21;62(6):1205-15

Yen P.M., Wilcox E.C., Chin W.W. 1995. *Steroid hormone receptors selectively affect transcriptional activation but not basal repression by thyroid hormone receptors.* Endocrinology. Feb;136(2):440-5.

Yumita W, Ikeo Y, Yamauchi K, Sakurai A, Hashizume K. 2003. *Suppression of insulin-induced AP-1 transactivation by menin accompanies inhibition of c-Fos induction.* Int J Cancer. Mar 1;103(6):738-44.