



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Determinación del papel transcripcional del
sitio CRE-1 del promotor del gen de TRH”**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

Adrián Pérez Maldonado

TUTORA:

Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo



México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del jurado

Datos del alumno:

Pérez
Maldonado
Adrián
01777 3767410
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
096085464

Datos del tutor

Dra.
Joseph
Bravo
Patricia Ileana

Datos sinodal 1

Dr.
Camacho
Carranza
Rafael

Datos sinodal 2

Dra.
Cote
Vélez
María Juana Antonieta

Datos sinodal 3

Dr.
Segovia
Forcella
Lorenzo Patrick

Datos sinodal 4

Dr.
León
Rodríguez
Renato

Datos del trabajo escrito

Determinación del papel transcripcional del sitio CRE-1 del promotor del gen de TRH
37 pp
2010

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. Patricia Ileana Joseph Bravo y se financió con los donativos DGAPA *IN-215507* y CONACyT *P-83363*. Durante la realización de esta tesis conté con el apoyo económico del Sistema Nacional de Investigadores.

Dedicado a la memoria de Enrique Pérez Maldonado

Agradecimientos

Agradezco a mis padres y a todos mis hermanos el apoyo recibido siempre. Gracias a ustedes he llegado hasta aquí.

Agradezco a la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo por permitirme trabajar en su laboratorio, por dirigir y revisar este trabajo y otorgarme todas las facilidades para realizarlo.

Agradezco a la Dra. Antonieta Cote Vélez por el apoyo recibido en mi formación, su ayuda técnica para la realización de los experimentos presentados y su participación en la revisión de este trabajo.

También a la Quim. Fidelia Romero Arteaga por su apoyo en la transformación de la cepa bacteriana y la purificación de los plásmidos empleados, al personal del laboratorio de neurobiología por su apoyo técnico y logístico: Sr. José Manuel Villa Herrera, Miguel Ángel Olvera Rodríguez y a la Sra. Cruz Elena Martell Lugo.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza, al Dr. Lorenzo Segovia Forcella y al Dr. Renato León Rodríguez por formar parte del comité encargado de la revisión de esta tesis y por sus valiosos comentarios.

Al Dr. Joel Osuna Quintero por el diseño y elaboración de los plásmidos mutantes empleados y a la Dra. Susana Castro Obregón por la donación del plásmido pCH110.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
El sistema neuroendócrino	2
El eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides.....	2
Antecedentes	3
La Hormona Liberadora de Tirotropina	3
El gen de TRH	4
Regulación de la biosíntesis de TRH.....	6
Justificación	9
Hipótesis	9
Objetivo general.	9
Objetivos particulares.	9
Estrategia Experimental	10
Materiales y métodos	11
Análisis in silico de los cambios en el promotor	11
Cultivos celulares.	12
Aplicación del estímulo.	14
Cosecha de los cultivos transfectados.	15
Cuantificación de proteína total.	15
Cuantificación de la actividad de luciferasa.....	16
Determinación de la actividad de beta-galactosidasa.	16
Normalización de la actividad de luciferasa.....	17
Resultados	17
Determinación de la cantidad de proteína a emplear en los ensayos de beta- galactosidasa y luciferasa.	18
Respuesta a 8Br-AMPC.	18
Respuesta a noradrenalina.....	20
Respuesta a otros activadores de PKA.	20
Mediación de CREB en respuesta al AMPC.	22
Cambio de línea celular.	23
Respuesta de los vectores mutantes al activador de PKA.....	23
Mutantes vs TRH-Luc.	26
Discusión	27
Conclusiones	31
Perspectivas	31
Bibliografía	32
Abreviaturas	36
Anexo	37
Preparación de soluciones	37

Resumen

El gen de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) está sujeto a regulación tanto positiva como negativa a través de la interacción de factores de transcripción con distintas secuencias en su promotor entre las que se encuentran, elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), a AMPc (CRE) y a hormonas tiroideas (THRE), siendo estos últimos reguladores positivo y negativo respectivamente. Estudios previos han propuesto que la regulación por AMPc mediada por la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) la cual es activada por fosforilación mediada por la proteína cinasa A (PKA), está dada por un sitio CRE localizado a -59/-52 pb del inicio de la transcripción (CRE-1 o sitio 4; Harris, *et al.*, 2001) el cual se sobrepone al sitio propuesto para la regulación por la hormona tiroidea T3 (-59/-54) mediado por el receptor a hormona tiroidea (TR) (Hollenberg, *et al.*, 1995; Satoh, *et al.*, 1996). Análisis recientes han demostrado la protección a la digestión por DNasa I del sitio CRE-2 (-101/-94) y no del sitio CRE-1 por extractos nucleares de células hipotalámicas estimuladas con 8Br-AMPc, mientras que el sitio CRE-1 está protegido cuando el estímulo es con T3 (Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010a) sugiriendo que en células hipotalámicas, CRE-2 es el elemento de respuesta a AMPc y CRE-1, de T3. Debido a la contradicción de estos resultados con los de Harris, *et al.*, (2001) quienes postulan a CRE-1 como sitio de reconocimiento de CREB fosforilado en la transcripción del gen de TRH, se emplearon cultivos celulares, el neuroblastoma SH-SY5Y y el glioblastoma C6, transfectados con vectores que codifican para un gen reportero bajo el control del promotor de TRH silvestre (TRH-Luc) así como otros que presentan mutaciones en el sitio CRE-1 (p766 y p767) o la sustitución de CRE-2 por CRE-1 (p1808). Las células transfectadas fueron estimuladas con un activador de la vía de PKA y cosechadas para medir la actividad del gen reportero. Los resultados muestran que las mutaciones que disminuyen o eliminan el reconocimiento de CRE-1 por CREB no interfieren con la respuesta al activador de PKA y que la presencia de dos sitios CRE-1 no reproduce la activación de la transcripción obtenida con el vector silvestre; por otro lado, si la mutación elimina la interacción de TR con CRE-1 se pierde la inhibición por hormona tiroidea sobre la actividad del reportero mientras que, cuando CRE-1 permanece intacto se observa una inhibición significativa. Estos resultados contribuyen a evidenciar que la respuesta a AMPc no se encuentra mediada por CRE-1.

Introducción

El sistema neuroendócrino

La homeostasis, el crecimiento, el desarrollo y la reproducción son regulados por interacciones entre el sistema endócrino y el sistema nervioso: casi todas las secreciones endócrinas son controladas directa o indirectamente por el cerebro y recíprocamente casi todas las hormonas ejercen una influencia sobre la actividad neuronal. Las células nerviosas y las del sistema endócrino poseen varios atributos en común: las neuronas tienen función secretora así como la capacidad de propagar potenciales de acción, y las células endócrinas poseen potenciales eléctricos y capacidad secretora. Tanto las neuronas como las glándulas endócrinas, estimulan diversas células blanco por medio de mediadores químicos que reaccionan con receptores celulares específicos (Reichlin, 1998). Existen varios tipos de células secretoras: las exócrinas que liberan sus productos hacia el exterior del cuerpo o hacia una cavidad que tiene comunicación con el exterior; las endócrinas que secretan hacia la circulación; y las neurohormonales las cuales son células nerviosas que liberan sus productos hacia la circulación. Además pueden clasificarse en parácrinas que ejercen una influencia sobre las células vecinas; y en autócrinas que regulan sus funciones por medio de sus propias secreciones (Reichlin, 1998). En la regulación neuroendócrina, los péptidos, también llamados neurohormonas, son liberados hacia la circulación para ejercer su acción a distancia (Akil, *et al.*, 2003).

Existen varios ejes neuroendócrinos reguladores organizados de una manera jerárquica con el control de su función iniciada en el cerebro, pasando por la pituitaria anterior y terminando con la producción de hormonas en un órgano determinado, entre estos se encuentran los ejes: hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) e hipotálamo-pituitaria-gónadas (HPG) (Akil, *et al.*, 2003).

El eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides

Ante distintos estímulos fisiológicos, las terminales axónicas de las neuronas parvocelulares del Núcleo Paraventricular (NPV) del hipotálamo, presentes en la eminencia media, liberan la Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH) al sistema portal que comunica al hipotálamo con la pituitaria o hipófisis. Una vez que entra en el sistema portal, la TRH es transportada hasta el lóbulo anterior de la pituitaria (o adenohipófisis) en donde se encuentran células que presentan los receptores para esta hormona. La interacción ligando-

receptor ocasiona la síntesis y liberación de la Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotropina (TSH) (Haisenleder, *et al.*, 1992) por células especializadas llamadas tirótrofos; la TSH es secretada hacia el sistema circulatorio en donde viaja hasta alcanzar la glándula tiroides en donde es reconocida por receptores que se encuentran en células foliculares, lo que estimula la producción de las hormonas T3 y T4 (Hormonas Tiroideas; TH) y su liberación hacia el sistema circulatorio (Zoeller, *et al.*, 2007). Un fuerte aumento en la concentración de TH ejerce un efecto retroalimentador negativo sobre la pituitaria y el NPV inhibiendo la síntesis y liberación de TSH (Shupnik y Ridgway 1987) y de TRH (Segersen, *et al.*, 1987b; Koller, *et al.*, 1987) respectivamente. Este sistema formado por el hipotálamo, la pituitaria y la tiroides, se denomina eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT) e incluye la comunicación entre estos por medio de hormonas (TRH, TSH y TH) (Bear *et al.*, 2001).

Como ya se mencionó una de las principales funciones del sistema neuroendocrino es la regulación de la homeostasis incluyendo el metabolismo basal, siendo las hormonas adrenales y tiroideas los principales factores catabólicos reguladores (Joseph-Bravo y de Gortari, 2007) siendo los ejes neuroendócrinos HPA y HPT fundamentales en el balance energético.

Antecedentes

La Hormona Liberadora de Tirotropina

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido con funciones neurales y endócrinas cuya secuencia es piroGlu-His-ProNH₂, que presenta ambas terminales bloqueadas (Boler, *et al*, 1969; Burgus, *et al.*, 1969) y que se deriva de un precursor proteico de 26 KDa (Lechan, *et al.*, 1986). Varias áreas del Sistema Nervioso Central sintetizan TRH entre las que se encuentran la amígdala, la pituitaria, el hipocampo, el bulbo olfatorio, los núcleos de rafé, el núcleo reticular talámico y varias regiones del hipotálamo como el área preóptica, los cuerpos mamilares, las áreas lateral y anterior, los núcleos dorsomedial, supraóptico y supraquiasmático, pero es en el NPV en donde presenta una mayor concentración (Lechan y Fekete, 2006). La TRH también se encuentra en otros tejidos como los testículos, el corazón, la próstata, los ovarios, el páncreas, la placenta e intestino (Iversen, 1995; Wilber y Xu, 1998).

La TRH producida en el NPV del hipotálamo es un componente integral para el mantenimiento de la homeostasis de las hormonas tiroideas (Lechan y Fekete, 2006). Ante distintos estímulos como el ayuno, estrés por frío, los ciclos circadiano y estral, etc., en las neuronas parvocelulares del NPV se sintetiza el mRNA de la TRH (Segersen, *et al.*, 1987a, 1987b). Una vez traducido el mRNA, el precursor es procesado y transportado a través de la vía de secreción regulada. Dentro del precursor, la secuencia del péptido que dará origen al biológicamente activo (Gln-His-Pro-Gly) se encuentra flanqueada por un par de residuos básicos (arginina o lisina); el corte inicial ocurre por la acción de las Pro-hormona Convertasas PC1 y/o PC2 en el extremo amino del par de aminoácidos básico seguido de la remoción de estos por la Carboxipeptidasa E (CPE) y la glicina terminal es modificada por la acción de la Peptidilglicina Alfa-amida Monooxigenasa (PAM); el primer aminoácido en el extremo amino (glutamina) es convertido a piroglutamil por la Glutamil Ciclasa (GTC). El procesamiento puede iniciar con las convertasas presentes en el retículo endoplásmico rugoso y el aparato de Golgi; la agregación de varias moléculas: el precursor, las PC1 y/o PC2, la CPE, PAM y la GTC se realiza en el trans-Golgi en donde se forman los gránulos de secreción. El transporte por la vía de secreción regulada lleva a los gránulos que contienen los precursores del péptido y las enzimas procesadoras (que continúan el procesamiento) hasta la eminencia media donde el TRH formado es liberado a los vasos sanguíneos del sistema portal en respuesta a un estímulo neuronal (Nillni y Sevarino, 1999).

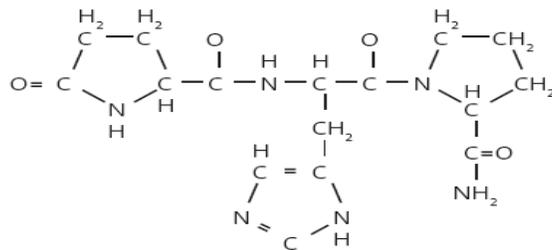


Figura 1. Estructura de la Hormona Liberadora de Tirotropina (TRH).

El gen de TRH

El precursor de la TRH corresponde a un único gen cuya secuencia se ha caracterizado en humano (Yamada, *et al.*, 1990), ratón (Wilber y Xu, 1998) rata (Lee, *et al.*, 1988), pollo (Vanderborne, *et al.*, 2005) y rana (Bulant, *et al.*, 1992; Ritcher, *et al.*, 1984) y que contienen varias copias del tripéptido (5 en rata y ratón, 6 en humano). De los tres exones presentes en el gen, el primero codifica para la región 5' no traducida del mRNA; el segundo para el péptido señal junto con una parte de la región amino terminal; y el tercero para el resto de la parte amino terminal, las copias generadoras del TRH, péptidos intermedios, la parte carboxilo terminal y la región 3' no traducida (figura 2).

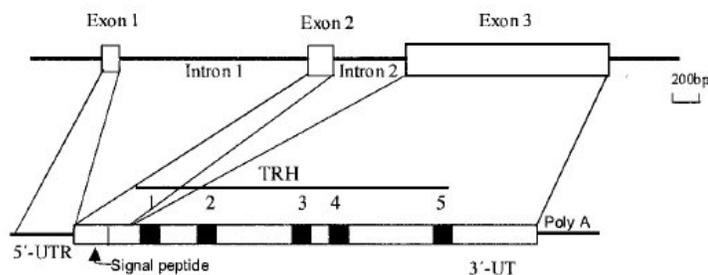


Figura 2. Representación de la estructura del gen de TRH en donde se observan las regiones para las que codifica cada exón. Tomado de Joseph-Bravo, *et al.*, 2006.

La secuencia comprendida entre las posiciones -547 y +84 (con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1)) del gen de TRH en rata (rTRH), confiere casi toda la actividad transcripcional basal en células transfectadas (Balkan, *et al.* 1998). En rata, ratón y humano, esta región presenta elementos de respuesta para los factores transcripcionales CREB (Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a AMPc), Proteína Activadora 1 (AP-1) y el

receptor de glucocorticoides (GR) (Joseph-Bravo, *et al.*, 2006) entre otros. La caja TATA se encuentra en la posición -28 (Lee, *et al.*, 1988). Dos elementos similares a la secuencia del Elemento de Respuesta a AMPc (CRE) se localizan en el promotor del gen TRH: a) el sitio 4 o CRE-1 (5' TGACCTCA 3') (Hollenberg, *et al.*, 1995; Harris, *et al.*, 2001) localizada en la posición -59/-52 y que se sobrepone con un Elemento de Respuesta a Hormona Tiroidea (THRE) (5' AGGTCA 3') que es reconocido como un sitio importante para la regulación negativa por TH y b) el sitio CRE-2 (5' TGCCGTCA 3') localizada en la posición -101/-94 (Yang, *et al.*, 1992). El promotor de TRH carece de una secuencia consenso canónica de Elemento de Respuesta a Glucocorticoides (GRE) sin embargo, varias copias del medio sitio de mayor afinidad (5' TGTCT 3') (Dahlman-Wright, *et al.*, 1991) se localizan en las posiciones -735, -560 y -210; además, presenta un sitio invertido cercano al consenso (5' GGTCCAcacTCTTGT 3') en -284 y dos medios sitios invertidos en -275 y -310 (Lee, *et al.*, 1988). Cerca de la posición -119 se puede identificar una región rica en GC que comúnmente se asocia a la Proteína Especifica 1 (SP1) y es conocida como el Elemento de Respuesta a SP1 (SP1RE). Elementos de Respuesta al Factor de Crecimiento Epidermal (EGFRE) y a TPA (TRE; también llamado Elemento de Respuesta a AP1: AP1RE) también se encuentran en el promotor del gen de TRH.

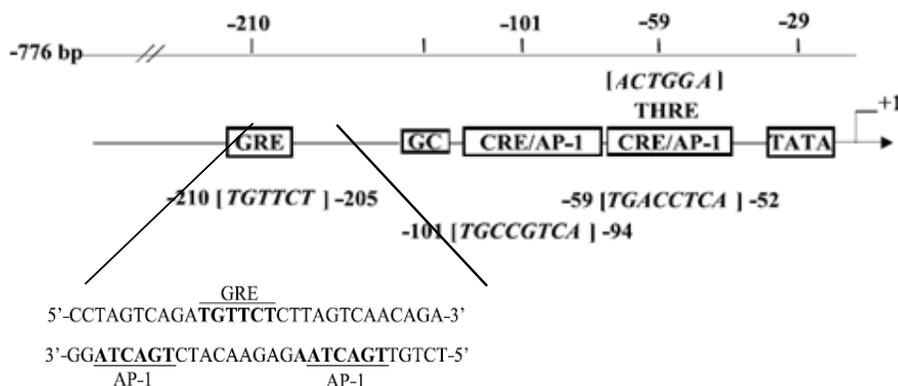


Figura 3. Representación gráfica del promotor del gen de TRH en donde se muestra la localización de la caja TATA (-29 pb) y de algunos de los elementos sujetos a regulación como el sitio GRE compuesto (-210pb), el sitio CRE-1 (-59pb) que se sobrepone a un sitio THRE y el sitio CRE-2 (-101 pb). Modificado de Cote-Vélez, Pérez-Martínez, *et al.*, 2005.

Regulación de la biosíntesis de TRH

La biosíntesis de la TRH en el NPV está sujeta a regulación por diversos factores tanto físicos como fisiológicos entre los que se encuentran el frío, la succión, el ayuno, los glucocorticoides, la leptina y por T3. Se ha demostrado que la exposición al frío induce la liberación de TRH en la eminencia media además de un aumento rápido y transitorio de los

niveles de mRNA de TRH en el NPV, incrementándose en minutos y regresando a los niveles basales a las 2 hrs aún si se mantiene el estímulo (Uribe, *et al.*, 1993; Sánchez, *et al.*, 2001). Los mismos resultados se han encontrado cuando una rata hembra lactante se somete al estímulo de la succión (Uribe, *et al.*, 1993) coincidente con la función del TRH de también controlar la síntesis y liberación de prolactina (Grosvenor y Mena, 1980).

Se ha demostrado que los glucocorticoides afectan la expresión del gen de TRH *in vivo* e *in vitro*, dependiendo de la dosis y duración del tratamiento. *In vivo*, la administración de corticosterona o dexametasona (dex; un análogo de glucocorticoides) disminuye los niveles del mRNA en el NPV (Kakucska, *et al.*, 1995). *In vitro*, se observa un efecto estimulador en los niveles de mRNA luego de un tratamiento de varios días con dex en la línea celular de carcinoma tiroideo CA77 (Tavianini, *et al.*, 1989), en cultivos de pituitaria anterior (Bruhn, *et al.*, 1994) y cultivos primarios de diencéfalo de rata (Luo, *et al.*, 1995); cultivos primarios de células hipotalámicas de rata, presentan una respuesta tiempo- y dosis-dependiente a dex: un rápido incremento (1 -3 horas) en los niveles de mRNA de TRH se observa cuando se estimula con concentraciones entre 10^{-8} y 10^{-6} M de dex, mientras que concentraciones más altas o más bajas o luego de 24 hrs de incubación con 10^{-8} M, producen un decremento en la presencia de éste (Pérez-Martínez, *et al.* 1998). La incubación de cultivos primarios con 8Br-AMPC (un análogo permeable del AMPc y activador de PKA) así como con TPA (un activador de PKC) ocasionan también un aumento en los niveles de RNAm de TRH, adicionalmente, se observa que este efecto estimulador se ve reducido cuando se incuba con ambas drogas, o en la co-incubación con dex y 8Br-AMPC así como con dex, 8Br-AMPC y TPA, sin embargo, si la incubación es con dex y TPA se observa un efecto estimulador aditivo en los niveles de mRNA de TRH (Pérez-Martínez, *et al.* 1998; Cote-Vélez, Pérez-Martínez, *et al.* 2005).

El papel estimulador de CREB en la transcripción del gen de TRH ha sido demostrado en un sistema heterólogo de células HEK293T transfectadas con un gen reportero (luciferasa) bajo el control del promotor del gen de TRH (Harris, *et al.*, 2001). La incubación de células con la Hormona Estimuladora de alfa-Melanocitos (α -MSH; la cual incrementa los niveles de CREB fosforilado [CREB-P]) por 8 hrs, aumenta la expresión del gen de TRH; este efecto estimulador de α -MSH se reduce en presencia de T3 más la transfección del Receptor a Hormona Tiroidea TR β 2 (Harris, *et al.*, 2001). Como se mencionó anteriormente, existen dos secuencias similares al consenso de CRE en el promotor de TRH. La secuencia CRE-1 (5' TGACCTCA 3') se sobrepone a un THRE (5' AGGTCA 3') y es reconocida como un sitio importante en la regulación negativa por TH (Hollenberg, *et al.*, 1995; Satoh, *et al.*, 1996). Se

ha reportado que esta región es capaz de mediar el efecto ocasionado por el aumento en los niveles de AMPc debido a que CREB transfectado se une a esta secuencia y, cuando se transfecta al promotor mutado por AAAA en este sitio, disminuye la transcripción basal y se pierde la respuesta a la estimulación por AMPc (Harris, *et al.*, 2001).

En el laboratorio, utilizando cultivos primarios de células de hipotálamos fetales de rata no pudo observarse la unión de extractos nucleares de células estimuladas con un análogo de AMPc a un oligonucleótido conteniendo la secuencia CRE-1 y sólo al que tenía la secuencia CRE-2 en la región -101/-94; ensayos de retardo electroforético revelaron la unión de CREB-P y c-Jun a este sitio. También se caracterizó el sitio de unión a GR (GRE) en -216/-199, éste se propone como un sitio GRE compuesto (GREc) ya que se encuentra flanqueado por dos sitios de reconocimiento a AP-1 en la cadena complementaria y sugiere la heterodimerización entre GR y c-Jun (Cote-Vélez, Pérez-Martínez, *et al.*, 2005). De entre los sitios CRE-1 y CRE-2, es sólo el segundo el que posee un dinucleótido interno CpG que es crítico para una adecuada unión de CREB-P (Schumacher, *et al.*, 2000).

Ensayos de "footprinting" con un fragmento de 806 pb del promotor de TRH (Balkan, *et al.*, 1998) mostraron que la región CRE-1 es protegida de la digestión por DNAsa I por extractos nucleares de células hipotalámicas estimuladas con T3 mientras que cuando las células son estimuladas con 8Br-AMPc los extractos nucleares protegen sólo la región CRE-2 (Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010a, 2010b). Adicionalmente se encontró mediante un análisis de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) que son CREB-P y c-Jun los factores que se unen a CRE-2 y no a CRE-1 luego del estímulo con 8Br-AMPc (Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010a). En conjunto, estos resultados indican que la activación de la transcripción del gen de TRH inducida por 8Br-AMPc está mediada por la unión de CREB-P (activado por PKA producto de la estimulación con 8Br-AMPc) a la región CRE-2 mientras que el sitio CRE-1 une al receptor de la Hormona Tiroidea T3 (TR) y no a CREB-P indicando que es el sitio CRE-2 y no el CRE-1 la región de mayor importancia en la regulación transcripcional del gen de TRH mediada por CREB-P.

Es importante recalcar la diferencia entre estos resultados y los de Harris y col. respecto al papel del sitio CRE-1 como elemento de respuesta a CREB-P. Mientras que los resultados de Díaz-Gallardo y colaboradores (2010a, 2010b) fueron obtenidos con cultivos homólogos (células hipotalámicas) cuyos extractos nucleares fueron identificados con los anticuerpos específicos, en el caso de Harris, se emplearon cultivos heterólogos (células HEK293T) transfectedos donde la señal de CREB endógeno era mínima y sólo se observó respuesta con

las células previamente transfectadas con un CREB exógeno. La transfección de CREB puede causar un exceso de este factor, permitiendo que se una a una secuencia de muy poca afinidad, lo que no ocurre al estudiar los factores endógenos de las células hipotalámicas (Cote-Vélez, Pérez-Martínez, *et al.*, 2005) confirmando la especificidad celular que presenta la unión de CREB (Cha-Molstad, Keller, *et al.*, 2004). Otra evidencia de Harris y colaboradores fue la utilización de un plásmido conteniendo al promotor de TRH con la secuencia CRE-1 mutada a: AAAA que evitó tanto la expresión basal como la respuesta a AMPc.

Si bien las evidencias obtenidas tanto por protección a DNAsa como por CHIP parecen concluyentes, queda la duda de que si el sitio de respuesta a AMPc es el sitio CRE-2, ya que mutaciones en CRE-1 no deberían inhibir la transcripción de TRH en las células neuronales, como lo reporta Harris en las células HEK293T, aunque existe la posibilidad de que la diferencia radique principalmente en la especificidad celular encontrada por Cha-Molstad y Keller (2004). Es importante por lo tanto evaluar el papel de los sitios CRE-1 y CRE-2 mediante experimentos de transfección en las células neuronales y determinar si en presencia de la mutación en CRE-1 se repiten los resultados de Harris.

Justificación

Las hormonas tiroideas participan en varios procesos, desde el desarrollo hasta el correcto desempeño de varias funciones fisiológicas como el mantenimiento de la homeostasis energética. Debido a que la TRH participa directamente en la regulación de la biosíntesis de las hormonas tiroideas es importante conocer los mecanismos por los que se regula la transcripción de ésta. Corroborar que el elemento de respuesta al receptor de hormonas tiroideas no es el mismo que para el factor de respuesta al AMPc como se ha propuesto, permite una mejor comprensión de eventos neuroendócrinos que participan en la regulación del eje tiroideo.

Hipótesis

La respuesta en la transcripción del gen de TRH a la activación de la vía de PKA se encuentra mediada por el sitio CRE-2, por lo que mutaciones en el sitio CRE-1, dejando intacto el CRE-2 no deberían tener efecto en la transcripción de TRH en respuesta a la activación de la vía de PKA.

Objetivo general.

Identificar el papel funcional del sitio CRE-1 para la expresión del gen de TRH en respuesta a activadores de la vía de PKA, empleando la transfección de cultivos de líneas celulares SH-SY5Y y C6 con vectores que codifican para el gen reportero de luciferasa bajo el control del promotor de TRH tanto silvestre como con mutaciones puntuales en CRE-1.

Objetivos particulares.

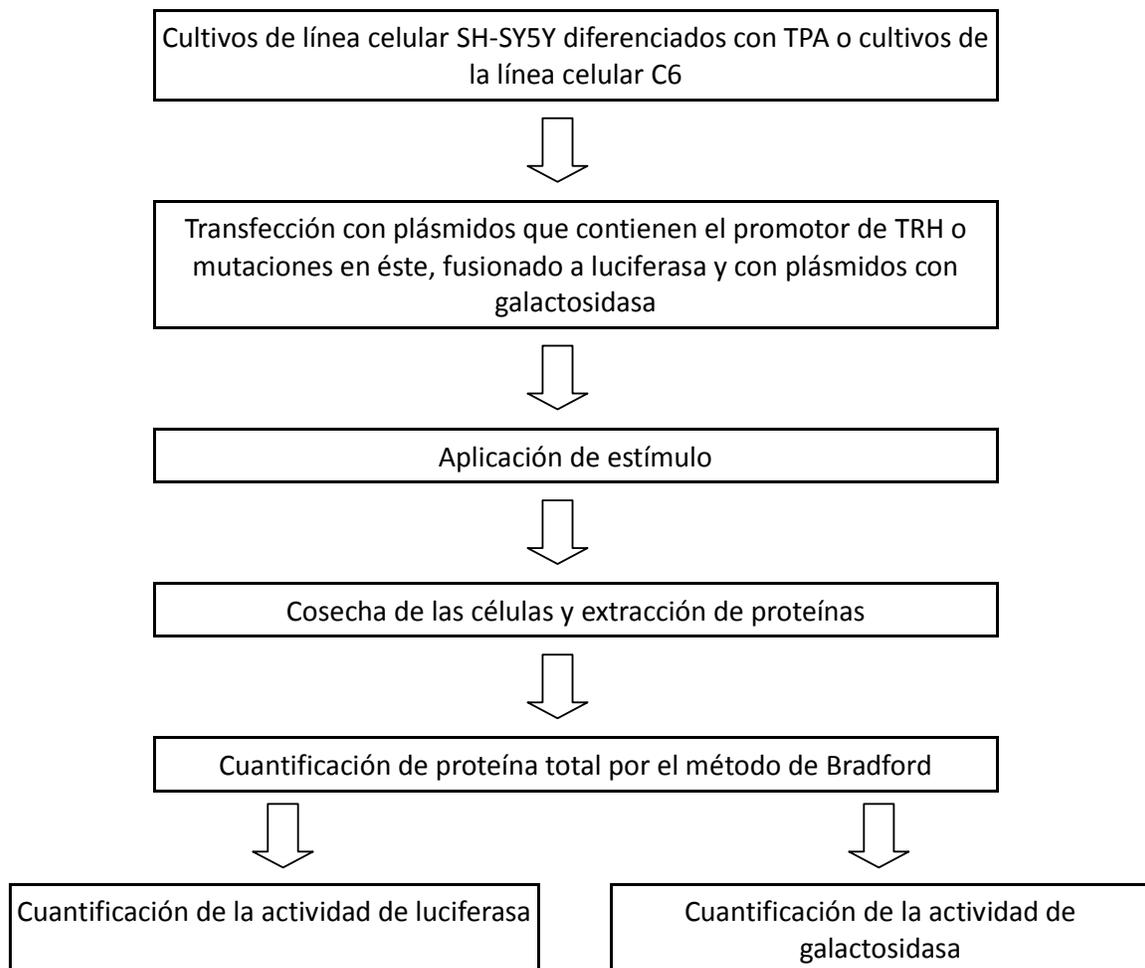
a) Determinar las condiciones de cultivo para un adecuado mantenimiento de las líneas celulares empleadas así como para lograr una mayor eficiencia en los ensayos de transfección.

b) Definir la concentración de proteína adecuada para medir la actividad de luciferasa y de beta-galactosidasa que permita observar cambios en la expresión de vectores que contienen el promotor de TRH tanto silvestre como mutado.

c) Cuantificar y analizar la respuesta a activadores de la vía de PKA en la expresión del gen reportero de la luciferasa acoplado al promotor de TRH silvestre, o conteniendo mutaciones en el sitio CRE-1

Estrategia Experimental

Cultivos del neuroblastoma humano SH-SY5Y diferenciados por una semana con TPA 16nM, o cultivos del glioblastoma de rata C6, fueron co-transfectados con vectores codificantes para la enzima luciferasa bajo el control del promotor del gen de TRH silvestre ó con mutaciones puntuales (tabla 1), y con un vector de expresión para la enzima beta-galactosidasa como control de la eficiencia de transfección. La transfección se realizó empleando el reactivo Lipofectamina™ 2000 y los cultivos transfectados se estimularon 48 hrs. después con un activador de la vía de PKA (8Br-AMPC, dbAMPC, Forskolina) a diferentes concentraciones y tiempos. Las células se cosecharon y se cuantificó la proteína total de cada una de las muestras por el método de Bradford. Se determinó la actividad específica de las enzimas luciferasa y beta-galactosidasa. Los valores de la actividad de luciferasa se normalizaron contra los valores de la actividad de beta-galactosidasa.



Materiales y métodos

Plásmidos

Bacterias *Escherichia coli* de la cepa DH5-alfa se transformaron con alguno de los siguientes plásmidos: pCH110 que contiene la enzima beta-galactosidasa bajo el control del promotor del virus SV40 (donado por la Dra. Susana Castro; Instituto de Biotecnología, UNAM), pUC18 (Fermentas), y ya sea el pNASS-TRH-Luc que codifica para la enzima luciferasa bajo el control del promotor del gen de TRH de rata (TRH-Luc; donado por el Dr. Wayne Balkan; Escuela de Medicina, Universidad de Miami), ó alguno de los tres plásmidos derivados del pNASS-TRH-Luc que presentan las distintas mutaciones en el promotor de TRH (p766, p767, p1808; realizadas por el Dr. Joel Osuna, Instituto de Biotecnología, UNAM, mediante la técnica de mutagénesis por sobreposicionamientos de PCR [Kammann, *et al.*, 1989]) (Tabla 1); los plásmidos pCREB y pCREB-A (donados por el Dr. Richard Goodman; Instituto Vollum, Universidad de Oregon) que codifican para la proteína CREB y una dominante negativa de ésta, respectivamente. Todos los plásmidos confieren resistencia a ampicilina. La purificación de los plásmidos se realizó empleando columnas de purificación comerciales (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Plásmido	Sitio CRE-1	Sitio CRE-2
TRH-Luc (silvestre)	T G A C C T C A	T G C C G T C A
p766	T G A <u>G G</u> T C A	T G C C G T C A
p767	T <u>I A A</u> C <u>G</u> C A	T G C C G T C A
p1808	T G A C C T C A	<u>I G A C C T C A</u>

Tabla 1. Mutaciones en los sitios CRE-1 y CRE-2 del promotor de TRH que presentan los plásmidos empleados. El plásmido pNASS-TRH-Luc contiene el promotor de TRH intacto. Las mutaciones puntuales en los sitios CRE se encuentran subrayadas y en itálicas. En el plásmido p1808 se substituyó la secuencia del sitio CRE-1 por la secuencia del sitio CRE-2.

Análisis in silico de los cambios en el promotor

Tanto las secuencias mutantes como la silvestre fueron sometidas a un análisis *in silico* para predecir la posible unión de factores de transcripción (MatInspector, Genomatix Software, GmbH 2009). Éste análisis se realizó empleando secuencias de distintas longitudes: -69/-42 (10 bases río arriba y 10 río abajo del sitio CRE-1); -112/-41 (que incluye los 2 sitios CRE más 10 bases en ambas direcciones) y una más extensa que también incluye a los dos

sitios (-226/+44). En todas éstas aparecieron los resultados descritos. En el análisis se encontró que tanto la secuencia mutante en p766 así como la silvestre pueden ser reconocidas por factores transcripcionales de la familia de CREB, en contraste, la mutante p767 no es reconocida por estos. De especial interés resultó el análisis de la mutante p1808 ya que, como era de esperarse, se predice el reconocimiento del sitio CRE-1 intacto (-59/-52) por CREB pero no del sitio CRE-1 insertado (-101/-94) aún cuando la secuencia es la misma. Esto podría indicarnos que las secuencias aledañas al sitio juegan un papel importante en su probable reconocimiento por el factor transcripcional.

Plásmido	Sitio -59/-52 CRE-1	Sitio -101/-94 CRE-2
TRH-Luc	T G A C C T C A (+)	T G C C G T C A (+)
p766	T G A <u>G G</u> T C A (+)	T G C C G T C A (+)
p767	T <u>I A A C G</u> C A (-)	T G C C G T C A (+)
p1808	T G A C C T C A (+)	<u>I G A C C T C A</u> (-)

Tabla 2. Probable reconocimiento de CREB a las mutaciones del promotor de TRH. El plásmido TRH-Luc contiene las secuencias silvestres. Las mutaciones se encuentran subrayadas y en itálicas. Análisis realizado con MatInspector, Genomatix Software, GmbH 2009. (+) = reconocido; (-) = no reconocido.

Cultivos celulares.

Cultivos de la línea celular SH-SY5Y (neuroblastoma humano) se mantuvieron, hasta alcanzar la confluencia, en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ y a 37⁰C (Revco-Ultima) en platos de cultivo estériles de 100mm de diámetro con medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado (DMEM-S) con 10% de suero fetal bovino (FBS; Biowest), glucosa 0.25% (Sigma), glutamina 2mM (Sigma), insulina 4 ug/uL (Sigma), vitaminas 1% (Gibco-BRL) y antibióticos-antimicóticos (50 unidades/mL de penicilina G sódica, 50ug/mL de sulfato de estreptomina y 0.125ug/mL de anfotericina B; Gibco-BRL) esterilizado por filtración a 22um (Millipore). La monocapa celular se lavó con 2mL de solución de Hank y posteriormente se desprendió utilizando 700uL de una solución de Tripsina-EDTA (Gibco). Las células desprendidas se recuperaron y fueron concentradas por centrifugación (1,200 rpm; Beckman TJ6) durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se desechó y el sedimento celular resultante se resuspendió mecánicamente en 3mL de DMEM-S empleando tres pipetas Pasteur de distintos diámetros. Para determinar

la viabilidad celular se tomaron 15uL de la suspensión celular y se mezclaron con 15uL del colorante azul de tripano dejándose incubar por 3 min; la membrana de las células muertas es permeable al colorante y se tiñen de azul. La mezcla se colocó en una cámara de conteo Neubauer (hemocitómetro; Hausser Scientific) y se contaron tanto las células teñidas como las no teñidas presentes en ambos cuadrantes en un microscopio óptico (Nikon SE) bajo el objetivo 40x. Para determinar el número de células vivas por microlitro se empleó la siguiente fórmula:

$$\frac{(\# \text{ de células vivas}) (\text{Factor de dilución}) (k)}{(\# \text{ de cuadros de } 0.05\text{mm contados})} = \# \text{ de células vivas / uL}$$

En donde: Factor de dilución = 2; k = 4,000; Número de cuadros contados = 800.

Para determinar el número de células vivas en la suspensión celular:

$$(\# \text{ de células vivas/uL}) (\text{uL de suspensión celular}) = \# \text{ células vivas en la suspensión celular}$$

Las células se sembraron en placas de 24 pozos (Corning) preincubados con poli-D-lisina (Sigma) por tres horas a 37⁰C y lavados tres veces con amortiguador de fosfatos salinos 1x (PBS 1x), a una densidad de 200,000 células/pozo. El volumen final de DMEM-S fue 500uL/pozo. Las células se mantuvieron en las mismas condiciones de humedad, CO₂ y temperatura previamente mencionadas.

Para el caso de la línea celular C6 (glioblastoma de rata) se siguió la misma metodología con algunas variantes: el medio de cultivo empleado fue F12 suplementado (F12-S) con 10% de suero fetal bovino (FBS; Biowest), glucosa 0.25% (Sigma), glutamina 2mM (Sigma), insulina 2 ug/uL (Sigma), vitaminas 0.5% (Gibco-BRL) y antibióticos-antimicóticos (25 unidades/mL de penicilina G sódica, 25ug/mL de sulfato de estreptomycin y 0.0625ug/mL de anfotericina B; Gibco-BRL).

Diferenciación y transfección de los cultivos.

En distintas ocasiones se ha reportado la presencia tanto de receptores de hormona tiroidea (Ortiz-Caro, *et al.*, 1986) y regulación de la expresión de proteínas mediada por T3 (Trentin y Alvarez-Silva, 1998) así como de la fosforilación mediada por la vía de PKA inducida por db-AMPC o forskolina (revisado en Cooper y Spaulding, 1985) en la línea celular C6 donde además, se observa una expresión basal de TRH, GR y Fos (Cote-Vélez, no publicado).

La línea celular SH-SY5Y requiere adquirir el fenotipo noradrenérgico para una adecuada

respuesta por lo que es necesario inducir la diferenciación de esta línea celular antes de aplicar el estímulo; la incubación con una concentración de 16nM de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), por al menos una semana, induce una diferenciación morfológica hacia un fenotipo noradrenérgico y una inhibición parcial en el crecimiento celular (Pahlman, *et al.*, 1984). Existen varios reportes de la presencia de CREB (Grimes y Jope, 2001; Rosethorne, *et al.*, 2008; Yaniv, *et al.*, 2008; Zhang, *et al.*, 2009) y de TR (Goya y Timiras, 1991) en esta línea celular sin embargo no expresan TRH (Aguilar-Valles, A., datos no publicados). Veinticuatro horas después de la siembra, se comenzó la diferenciación de las células SH-SY5Y con TPA disuelto en DMEM-S para una concentración final de 16nM. El agente se mantuvo durante ocho días, haciendo cambio de medio de cultivo cada 48 horas. Al octavo día de diferenciación, se cambió el medio por DMEM-S sin antibióticos-antimicóticos ni TPA, para luego de veinticuatro horas, realizar la transfección de las células.

Las células SH-SY5Y diferenciadas, o las C6, se transfectaron con LipofectaminaTM 2000 (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, el medio de incubación es reemplazado por DMEM suplementado sólo con glucosa (DMEM+G); por pozo, se diluyen 3uL de LipofectaminaTM 2000 en 47uL de DMEM+G (volumen final 50uL) (tubo 1) y se deja incubar por cinco minutos a temperatura ambiente; aparte, se diluyen 800ng totales de DNA plasmídico en DMEM+G para un volumen final de 50uL (tubo 2); se mezcla el contenido de ambos tubos (volumen total = 100uL) y se deja incubar por veinte minutos a temperatura ambiente (mezcla de transfección: MT) La MT se agrega al pozo y las placas se mantienen en las condiciones de cultivo por aproximadamente 5 horas luego de las cuales se realiza el cambio de medio a DMEM-S; las células se mantienen en las condiciones de cultivo hasta la aplicación del estímulo. Para las células C6 se utiliza F12 en lugar de DMEM.

Las células fueron transfectadas con tres plásmidos: TRH-Luc o alguna de sus variantes (p766, p767, p1808) para medir la actividad transcripcional del promotor de TRH en condiciones basales y estimuladas; pCH110 para medir la actividad de la beta-galactosidasa y emplearla como control de transfección; y pUC18 para completar la cantidad total de DNA en la transfección. En algunos casos se utilizó el plásmido pCREB o el pCREB-A además de los vectores ya mencionados.

Aplicación del estímulo.

Aproximadamente cuarenta y ocho horas después de la transfección, los cultivos celulares fueron estimulados por distintos periodos así como con distintas concentraciones de alguno

de las siguientes compuestos: dibutilil monofosfato de adenosina cíclico (dbAMPc; Sigma), 8-bromo monofosfato de adenosina cíclico (8Br-AMPc; Sigma), forskolina (Forsk; Sigma), noradrenalina (NA; Sigma). Brevemente, cuando se estimuló con los compuestos activadores de PKA (8br-AMPc, dbAMPc, Forsk, NA), 6hrs antes de la cosecha el medio de cultivo se cambia por uno que no se encuentre suplementado con FBS; unos minutos antes del estímulo el compuesto es diluido en medio suplementado sólo con glucosa; el medio presente en los pozos es sustituido por el que tiene la droga disuelta y permanece por el lapso del estímulo hasta el momento de la cosecha. Durante los periodos en los que no hay manipulación de los cultivos, éstos permanecen en las condiciones de humedad y temperatura descritas anteriormente.

Cosecha de los cultivos transfectados.

Transcurrido el tiempo de los estímulos, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas con 500uL/pozo de PBS 1x. Las células fueron cosechadas colocando 50uL/pozo de amortiguador de lisis celular (cell culture lysis reagent, Promega) y recogiendo el lisado en tubos mantenidos en hielo. Los restos celulares se sedimentaron centrifugando a 12,000 x g por aproximadamente dos minutos a 4⁰C. El sobrenadante se recuperó (extracto celular) y se mantuvo a -70⁰C hasta su empleo.

Cuantificación de proteína total.

Para conocer la cantidad de proteína presente en el extracto celular se siguió el método descrito (Bradford, 1976). Brevemente, se realizó una curva estándar para cada ensayo con concentraciones conocidas de proteína mezclando cantidades crecientes de una solución stock de albúmina sérica bovina (BSA; Sigma) 0.2 ug/uL con un volumen constante de reactivo de ensayo de proteína (Reactivo de Bradford; BioRad Labs.) y completando con agua bidestilada para un volumen final de 1ml (tabla 3). Las mezclas conteniendo las muestras experimentales se prepararon con 2uL de extracto celular, 200uL de reactivo de Bradford y 798uL de agua bidestilada. Tanto las muestras experimentales como las mezclas para la curva estándar se prepararon por duplicado, se agitaron en vortex y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos previo a la lectura de su absorbancia a una longitud de onda de 595nm en espectrofotómetro (Beckman DU-650).

Volumen de agua (uL)	Volumen de solución de BSA 2ug/uL (uL)	Volumen de reactivo de Bradford (uL)	Concentración final de BSA (ug/mL)
797.5	2.5	200	0.5
795	5	200	1
790	10	200	2
780	20	200	4
770	30	200	6
760	40	200	8
750	50	200	10
740	60	200	12
730	70	200	14
720	80	200	16
710	90	200	18
700	100	200	20

Tabla 3. Preparación de la curva estándar para la determinación de la concentración de proteína. Cada una de las mezclas se preparó por duplicado. Las mezclas se agitaron en vortex y se incubaron por cinco minutos previo a su lectura en espectrofotómetro.

Cuantificación de la actividad de luciferasa.

La luciferasa de luciérnaga es ampliamente utilizada como gen reportero; es una proteína monomérica de 61 kDa que cataliza la oxidación de la luciferina usando ATP y Mg^{2+} como co-sustrato. Durante la reacción se produce luz al convertirse la energía química de la oxidación de la luciferina a través de una transición electrónica, produciéndose la oxiluciferina. La emisión total de luz es proporcional a la cantidad de luciferasa presente (Brasier y Fortin, 1995).

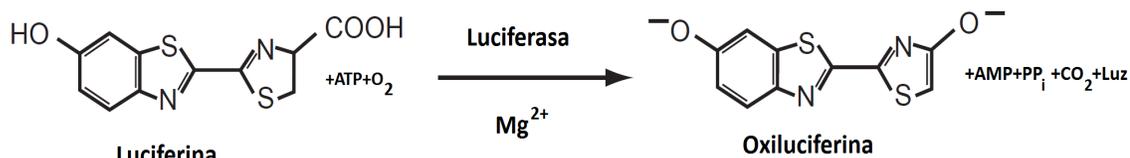


Figura 4. Reacción bioluminiscente catalizada por la luciferasa.

La cuantificación de la actividad de luciferasa se realizó en un luminómetro (Monolight). Por muestra, se colocaron 100uL de Luciferase Assay Reagent que contiene luciferina (Luciferase Assay System, Promega) en tubos para luminómetro; por separado, 5ug de proteína de extracto celular se llevaron a 20uL de volumen total con agua bidestilada, estos se adicionaron a la luciferina y se midió la emisión de luz (RLU; Unidades Relativas de Luz) durante un periodo de 10 segundos a temperatura ambiente.

Determinación de la actividad de beta-galactosidasa.

El gen de beta-galactosidasa es ampliamente utilizado como un control de la eficiencia de transfección. La enzima beta-galactosidasa se encuentra en una gran variedad de organismos aunque la principal fuente de estudio ha sido en la bacteria *Escherichia coli*. Aunque la lactosa es el principal sustrato de esta enzima, se ha observado que también es capaz de catalizar la hidrólisis de *o*-nitrofenil beta-D-galactopiranosida (ONPG) dando como producto un cromógeno llamado *o*-nitrofenol (ONP), el cual puede ser fácilmente detectado por su absorbancia a una longitud de onda de 420nm (Brasier y Fortin, 1995).

La cuantificación de la actividad de beta-galactosidasa se realizó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405nm. Se tomaron 50ug de proteína de extracto celular y se llevó a un volumen de 30uL con agua bidestilada, se mezcló con una solución amortiguadora consistente de 3uL de solución 100x Mg ($MgCl_2$ (Sigma) 0.1M, beta-mercaptoetanol 4.5M), 201uL de fosfato de sodio 0.1M pH7.5 (41mL de Na_2HPO_4 (Sigma) 0.2M, 9mL de NaH_2PO_4 (Sigma) 0.2M, 50mL de agua bidestilada) y 66uL de ONPG 4mg/mL (ONPG (Sigma) disuelto en fosfato de sodio 0.1M pH7.5) y se incubó a 37°C hasta que alcanzó la coloración amarilla característica (Sambrook, *et al.*, 1989). La intensidad del color es proporcional a la cantidad de ONPG hidrolizado y por lo tanto a la cantidad de enzima presente (Sambrook, *et al.*, 1989).

Normalización de la actividad de luciferasa.

Los valores RLU de la actividad de luciferasa para las distintas muestras pueden reflejar la modulación de la transcripción debida al estímulo, sin embargo, las diferencias que se observan entre los valores RLU para los distintos tratamientos puede deberse también a las variaciones en el número de células presentes en cada pozo o a la eficiencia de transfección lograda en cada ocasión, es por ello que los valores obtenidos en los ensayos de luciferasa fueron divididos por los valores obtenidos de la actividad de beta-galactosidasa.

Análisis estadístico de los resultados.

Los datos representan el promedio \pm error estándar de la media (E.S.M.) de los valores obtenidos para cada una de las condiciones. A los resultados se les aplicó un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA) seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey con el software SPSS 13.0. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Determinación de la cantidad de proteína a emplear en los ensayos de beta-galactosidasa y luciferasa.

Para determinar la cantidad ideal de proteína a ocupar en los ensayos de luciferasa, se probaron 7 cantidades de proteína distintas en un ensayo (0.5, 1, 1.5, 5, 7.5, 10 y 20ug). En la figura 5 se observa que a partir de 1.5ug la actividad se encuentra en la fase lineal, por lo que se decidió utilizar 5ug de proteína para los ensayos de luciferasa.

En el caso del ensayo de beta-galactosidasa, la prueba se realizó con 4 cantidades de proteína total: 15, 30, 45 y 60ug, teniendo una pendiente constante entre 30 y 60 por lo que se decidió utilizar 50ug. A esta concentración se obtenía la coloración suficiente para una óptima lectura (figura 6).

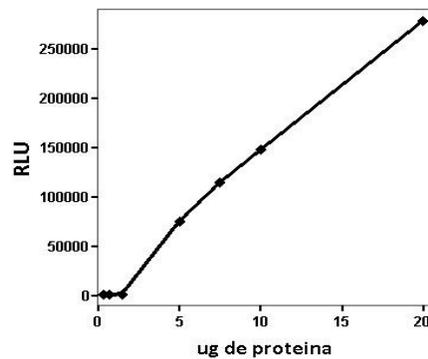


Figura 5. Actividad de luciferasa determinada empleando cantidades ascendentes de proteína total. Células SH-SY5Y transfectadas con el vector TRH-Luc se estimularon con 8Br-AMPC 1mM durante 3hrs. (RLU = Unidades Relativas de Luz).

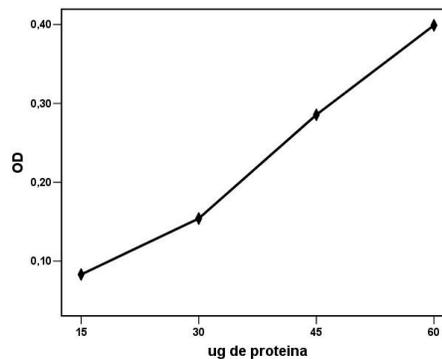


Figura 6. Actividad de beta-galactosidasa determinada utilizando 15, 30, 45 y 60ug de proteína total. Células de la línea SH-SY5Y transfectadas con el vector pCH110 fueron cosechadas, cuantificada la cantidad de proteína y ensayado para actividad de beta-galactosidasa. (O.D. = densidad óptica).

Respuesta a 8Br-AMPC.

Trabajos previos reportan el uso de una concentración de 1mM de 8Br-AMPC para observar un aumento en la transcripción del gen de TRH medida por la cantidad de mRNA de TRH, actividad del gen reportero luciferasa o cantidad de péptido liberada al medio, aunque las respuestas varían de acuerdo al tipo de células empleadas (cultivos primarios, neuroblastoma, fibroblastos, etc.), tiempos de estimulación (desde 1 hasta 3hrs) y si las células fueron o no transfectadas (Pérez-Martínez, *et al.*, 1998; Cote-Vélez, Pérez-Martínez, *et al.*, 2005; Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010a, 2010b). Se hizo un primer ensayo estimulando células SH-SY5Y con 8Br-AMPC 1mM por 3hrs. Los resultados se presentan en la figura 7.

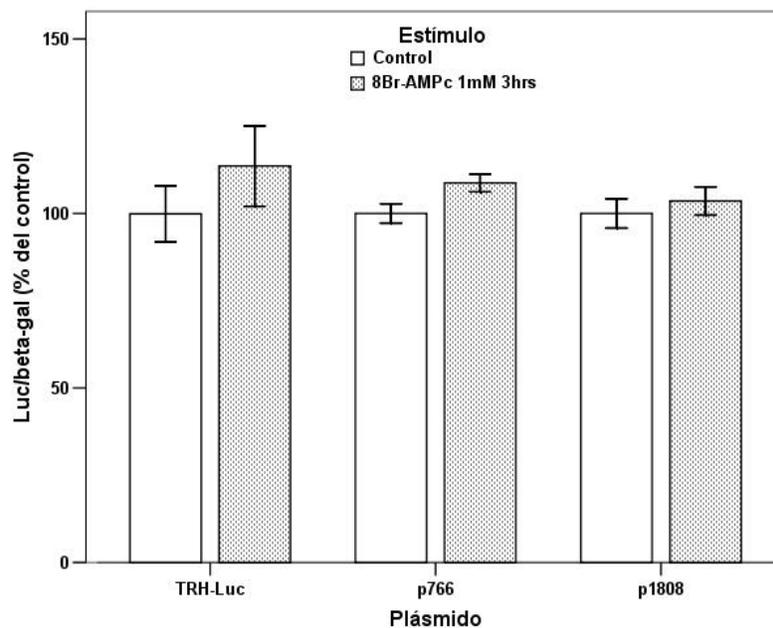


Figura 7. Respuesta de los distintos vectores a estímulos con 8Br-AMPC. No existen diferencias significativas en la actividad Luc/beta-gal entre las células que fueron estimuladas y las células control. Control = células transfectadas sin estimular. TRH-Luc: n=8; p766: n=4; p1808: n=6. Promedios \pm ESM.

Ya que no se obtuvo una respuesta significativa en estas condiciones, se probaron distintas dosis y tiempos de estimulación (100 y 500uM, 3mM; 3, 4 y 5hrs). Los resultados se presentan en la figura 8, donde se puede observar que los estímulos con 8Br-AMPC a 3 y 4hrs muestran sólo una tendencia al aumento actividad del gen reportero, que es significativo después de 5hrs con 3mM de 8Br-AMPC (44% más que el control).

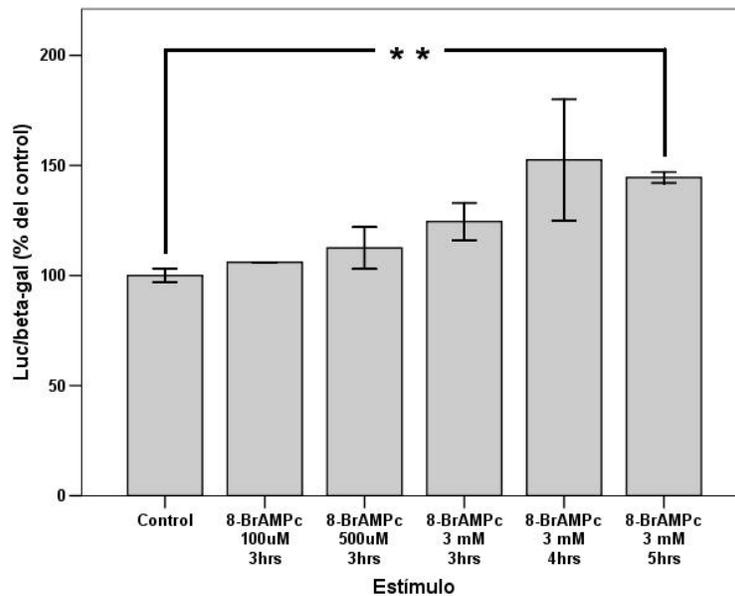


Figura 8. Dosis-respuesta y cinética de respuesta a 8Br-AMPC. Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas con el vector TRH-Luc fueron estimuladas con 8Br-AMPC 100uM, 500uM ó 3mM por 3hrs, ó 3mM por 4 y 6hrs. Control = células transfectadas sin estimular. n=2. Promedios \pm ESM. (** = $p < 0.032$).

Respuesta a noradrenalina.

La noradrenalina, neurotransmisor que media la respuesta al frío (Arancibia, *et al.*, 1996) y que activa la vía de PKA mediante su interacción con los receptores beta-adrenérgicos acoplados a proteínas G y la consecuente activación de la adenilato ciclasa (Wallukat, 2002), se probó a una concentración de 10nM en un estímulo de 3hrs obteniéndose un aumento significativo (85% por arriba del control; figura 9). Este resultado indicó que los componentes que participan de la respuesta AMPc se encontraban funcionales y que la falta de respuesta anterior pudiera deberse a que los tiempos fueron muy cortos para detectar diferencias.

Respuesta a otros activadores de PKA.

Debido al poco incremento en la actividad del gen en respuesta al 8Br-AMPC (sólo 44% más) comparado con otros reportes (hasta 800% más; Cote-Vélez, Pérez-Martínez, *et al.* 2005) se decidió probar otros activadores de la vía de PKA: la forskolina y db-AMPC. Para el db-AMPC se probaron varias dosis, siendo 1mM la dosis que ocasionó un mayor aumento en la actividad del reportero (Barrera-Dircio, 2010). Se realizó una cinética de respuesta empleando esta concentración (figura 10); sólo después de 6 hrs de estímulo se observa una diferencia significativa en la respuesta del vector silvestre (69% por arriba del control). Cuando se utilizó 10uM de forskolina como activador de la vía de PKA se observa a las 3h un incremento de 52% más que el control pero que no alcanza a ser significativo (figura 11).

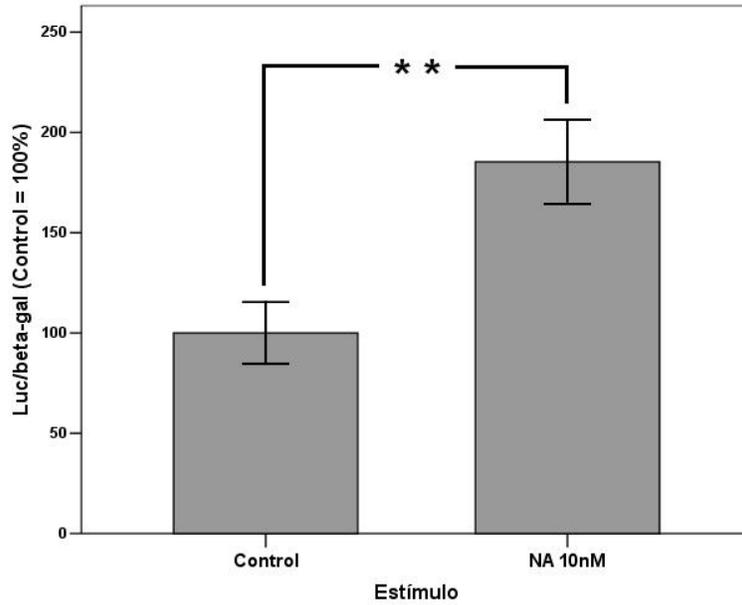


Figura 9. Respuesta a Noradrenalina. Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas con el vector TRH-Luc fueron estimuladas con noradrenalina (NA) 10nM durante 3hrs. Control = células transfectadas sin estimular. n=3. Promedios \pm ESM. (** = $p < 0.023$).

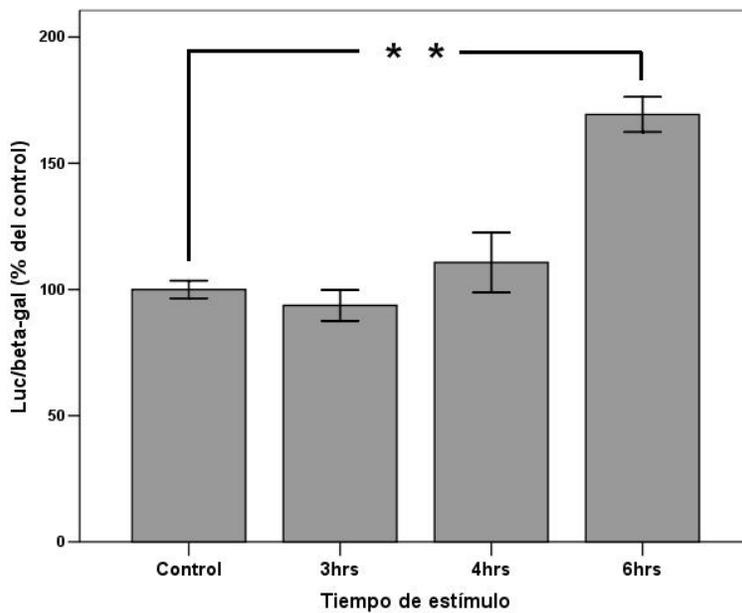


Figura 10. Cinética de respuesta a db-AMPC. Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas con el vector TRH-Luc fueron estimuladas con db-AMPC 1mM durante 3, 4 ó 6hrs. Control = células transfectadas sin estimular. n=3. Promedios \pm ESM. (** = $p < 0.011$).

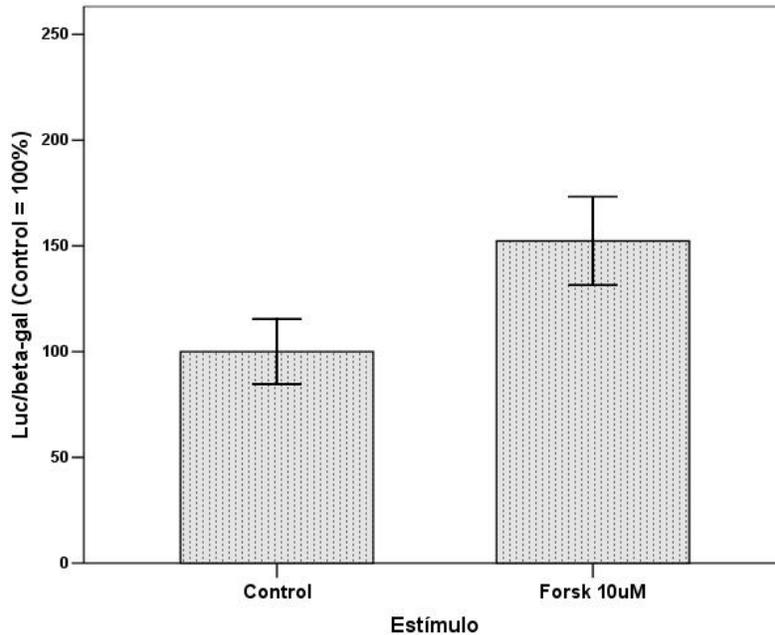


Figura 11. Respuesta a forskolina. Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas con el vector TRH-Luc fueron estimuladas con forskolina (Forsk) 10uM durante 3hrs. Control = células transfectadas sin estimular. n=3. Promedios \pm ESM.

Mediación de CREB en respuesta al AMPc.

Debido a que la respuesta a los activadores de la vía de PKA eran bajas, decidimos probar si esto se debía a que el CREB endógeno no presentaba la misma afinidad al promotor empleado que las células de cultivo primario de hipotálamo; se realizaron ensayos en los que se co-transfectó el plásmido TRH-Luc con varias cantidades de un vector que codifica para la proteína CREB de rata (pCREB) o con uno que codifica para una versión dominante negativa de ésta (pCREB-A). Los resultados muestran un ligero aumento en la expresión de luciferasa en respuesta al db-AMPC cuando se co-transfecta con pCREB a concentraciones de 75 o 150ng, mientras que si se co-transfecta con la dominante negativa de CREB (CREB-A), la actividad de luciferasa es menor incluso que los controles que no fueron estimulados (figura 12). Estos resultados nos indican que aún el CREB proveniente de rata era capaz de reconocer a CRE en el plásmido TRH-Luc pero la respuesta seguía siendo pobre. No parece entonces ser debida a problemas con interacción CRE-CREB y quizá a bajas concentraciones en otros factores nucleares requeridos como por ejemplo, CBP.

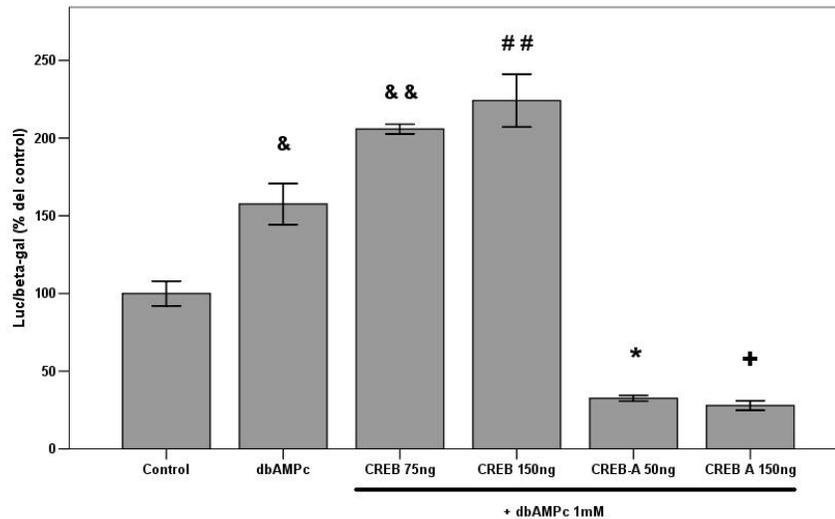


Figura 12. Mediación de CREB en la respuesta a AMPc. Células SH-SY5Y diferenciadas y transfectadas con el vector TRH-Luc y con distintas cantidades de pCREB o pCREB-A fueron estimuladas con db-AMPc 1mM durante 6hrs. Control = células transfectadas con TRH-Luc sin estimular; dbAMPc = células control estimuladas con dbAMPc. Promedios \pm ESM. n=3. (& = $p < 0.003$ vs control; && = $p < 0.0001$ vs control y $p < 0.025$ vs dbAMPc; ## = $p < 0.0001$ vs control y $p < 0.005$ vs dbAMPc; * = $p < 0.005$ vs control y $p < 0.0001$ vs dbAMPc; + = $p < 0.001$ vs control y $p < 0.0001$ vs dbAMPc). Experimento realizado en conjunto con Benito Barrera Dircio.

Cambio de línea celular.

La línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y fue utilizada en un intento de emplear un sistema de neuronas que pudiera estar representando más cercanamente lo sucedido *in vivo*, sin embargo, además de la pobre respuesta a forskolina o análogos del AMPc, tuvimos problemas en la reproducibilidad de resultados debido quizá al reto fisiológico impuesto por la transfección ya que ocasionaba una morfología alterada comparada con la que tenían previo al tratamiento y por lo general el número de células después de la transfección no superaba el 60% del inicial. Se decidió entonces cambiar a las líneas celulares C6 (glioblastoma de cerebro de ratón) que mostraron una mejor respuesta después de 3hrs con forskolina 10uM (230%) comparado a NIH-3T3 (fibroblasto de embrión de ratón) y Neuro2a (neuroblastoma de cerebro de ratón) (Barrera-Dircio, 2010).

Respuesta de los vectores mutantes al activador de PKA.

Se procedió a realizar las transfecciones en las células C6 empleando los vectores con las distintas mutaciones en el promotor de TRH utilizando la respuesta del vector silvestre (TRH-Luc) como control de respuesta basal a los diferentes tiempos que se aplicaba el estímulo. El vector mutante p766 tiene el sitio CRE-2 intacto pero una mutación en el sitio CRE-1 (TGAGGTCA en lugar de TGACCTCA; ver tabla 1); éste responde a forskolina 10uM (4 y 6hrs)

en forma similar al vector silvestre, en forma proporcional al tiempo de incubación, si bien a las 6hrs se observa un mayor incremento en el vector p766 comparado al silvestre (fig 13).

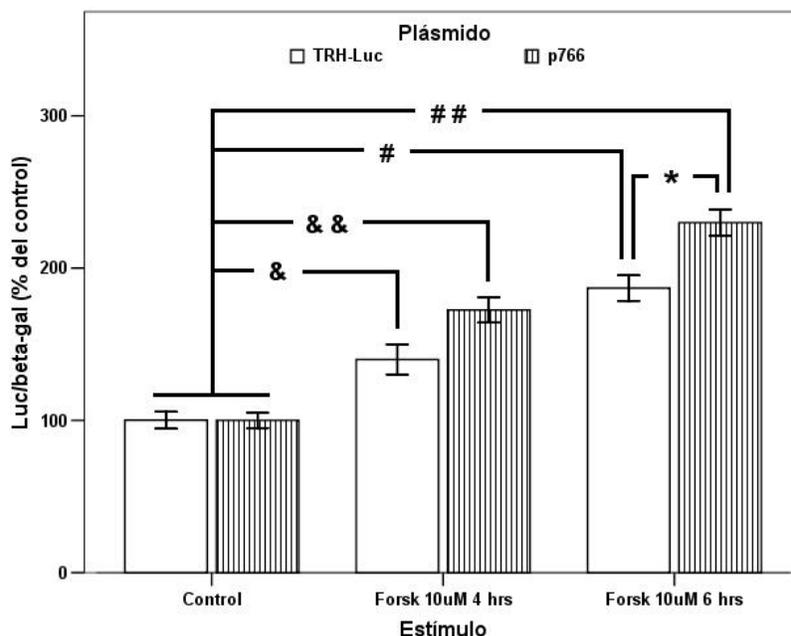


Figura 13. Respuesta del vector p766 a la forskolina. Células C6 transfectadas con los vectores TRH-Luc (TGACCTCA) o p766 (TGAGGTCA) fueron estimuladas con forskolina (Forsk) 10uM durante 4 ó 6hrs. Control = células transfectadas sin estimular. Promedios \pm ESM. Controles: n=6; Forsk 4 y 6hrs: n=8. (* = $p < 0.011$; ## = $p < < 0.0001$; # = $p < < 0.0001$; && = $p < < 0.0001$; & = $p < 0.048$).

El vector p767, que presenta una mutación en el sitio CRE-1 (TTAACGCA en vez de TGACCTCA) y el sitio CRE-2 idéntico al silvestre (ver tabla 1), incrementó la actividad de la luciferasa conforme al tiempo de exposición al activador de PKA; en este cultivo, el estímulo por 4hrs de los controles sólo es significativo si se analiza con una prueba T ($p < 0.05$). La comparación interplásmidos con el mismo tiempo de estímulo no arroja diferencias significativas (figura 14).

Para corroborar si el sitio CRE-1 contribuye a la respuesta por AMPc, y no toda es debida al CRE-2, se empleó la mutante p1808 en el cual el sitio CRE-2 fue reemplazado por una secuencia idéntica a la de CRE-1. Como se observa en la figura 15, este vector no causó respuesta al estímulo de forskolina por 4 hrs; en las células estimuladas por 6hrs se obtiene una leve estimulación de menor magnitud a la del plásmido silvestre.

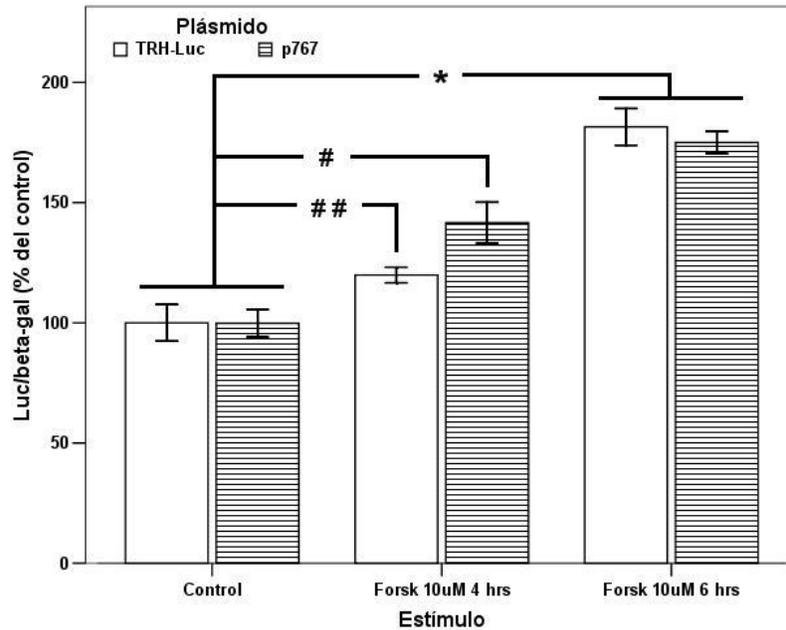


Figura 14. Respuesta del vector p767 a la forskolina. Células C6 transfectadas con los vectores TRH-Luc (TGACCTCA) o p767 (TAAACGCA) fueron estimuladas con forskolina (Forsk) 10uM durante 4 ó 6hrs. Control = células transfectadas sin estimular. Promedios \pm ESM. Controles: n=6; Forsk 4 y 6hrs: n=8. (* = $p < < 0.0001$; # = $p < 0.001$; ## = $p < 0.05$ [prueba T]).

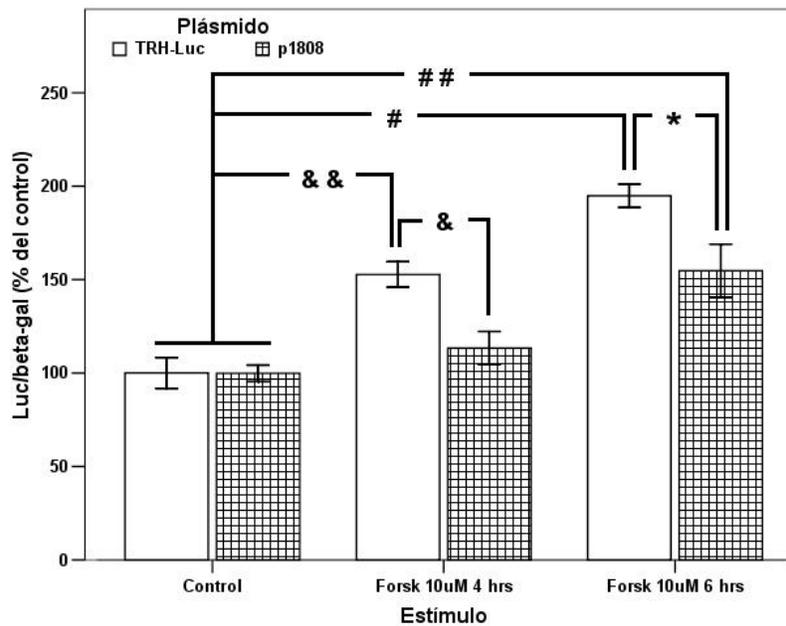


Figura 15. Respuesta del vector p1808 a la forskolina. Células C6 transfectadas con los vectores TRH-Luc (TGCCGTCA) o p1808 (TGACCTCA) fueron estimuladas con forskolina (Forsk) 10uM durante 4 ó 6hrs. Control = células transfectadas sin estimular. Promedios \pm ESM. Controles: n=10; Forsk 4 y 6hrs: n=8. (* = $p < 0.012$; # = $p < < 0.0001$; ## = $p < 0.0001$; & = $p < 0.015$; && = $p < 0.0001$).

Mutantes vs TRH-Luc.

La mayoría de los experimentos fueron diseñados de tal manera que se trabajara con dos placas de 24 pozos: una placa fue transfectada con el vector silvestre y la otra con un vector mutante. Las gráficas 13, 14 y 15 reflejan el promedio de dos experimentos independientes en los que las barras expresan el porcentaje de actividad con respecto a las células transfectadas con el mismo plásmido pero sin estimular (control). Para evaluar el grado de respuesta de cada plásmido comparado al silvestre, la actividad de luciferasa se calculó en porcentaje del control del plásmido silvestre de cada cultivo (figura 16). Las mutantes p767 y p1808 tuvieron una expresión basal significativamente menor que la presentada por el vector silvestre e inclusive en este último el estímulo por 4 y 6hrs con forskolina ni siquiera logra alcanzar los niveles basales del TRH-Luc. Si el sitio CRE-2 es el responsable de la activación transcripcional producida por AMPc entonces el plásmido 1808 no debería presentar actividad basal ni respuesta a la activación de PKA, sin embargo el sitio GREc localizado en -210/-205 podría ser el responsable de los niveles de actividad obtenidos ya que se ha visto que la estimulación con 8Br-AMPC produce la unión de c-Jun a los sitios AP1 del GREc (Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010b).

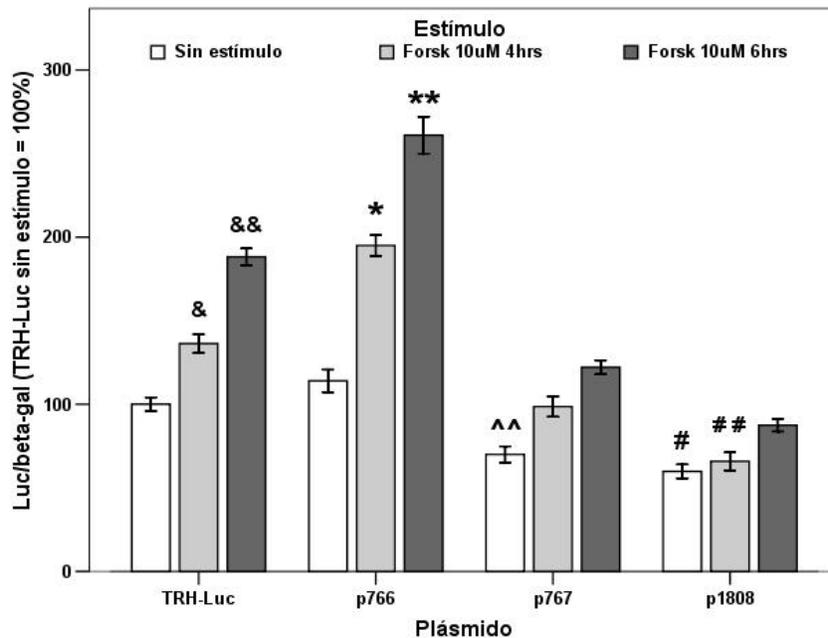


Figura 16. Respuesta de los vectores a la forskolina.. (&=p<0.0001 vs TRH-Luc sin estímulo; &&=p<<0.00001 vs TRH-Luc sin estímulo; *=p<<<0.00001 vs TRH-Luc sin estímulo; **=p<<<0.00001 vs TRH-Luc sin estímulo; ^^=p<0.0005 vs TRH-Luc sin estímulo [prueba T]; # = p<0.0006 vs TRH-Luc sin estímulo; ## = p<0.038 vs TRH-Luc sin estímulo).

Discusión

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la participación del sitio CRE-1 en la regulación de la transcripción del gen de TRH en respuesta a la activación de la vía de PKA. Para ello, se utilizaron células transfectadas con el promotor de TRH unido a un gen reportero, luciferasa, con la secuencia original así como con 3 distintas variantes, dos con una mutación en el sitio CRE-1 y la otra con una mutación en el sitio CRE-2. Los análisis *in silico* realizados a las distintas secuencias del promotor permitieron anticipar hasta cierto grado los posibles resultados a obtener teniendo en cuenta la hipótesis de que es el sitio CRE-2 y no el CRE-1 el que participa de la respuesta a AMPc. Como se mencionó en la introducción, dicha hipótesis está basada en resultados obtenidos en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata utilizando varias estrategias complementarias: EMSA, protección a DNasa I (*footprinting*) y CHIP. Todas ellas muestran al sitio CRE-2 como el elemento de respuesta al cual se une CREB-P en respuesta a la activación de la PKA. Sin embargo, Harris y colaboradores (2001), empleando plásmidos con una mutación de cuatro adeninas en el sitio CRE-1 (TAAAATCA), encontraron inhibición tanto de la respuesta al activador de PKA como de la expresión basal o en un promotor que sólo contenía las 50 bases contiguas del sitio +1. Al estar intacto el CRE-2, no se explica el por qué de esta inhibición. El Dr. Joel Osuna (Instituto de Biotecnología, UNAM), quien hizo las mutantes empleadas en este trabajo, intentó generar una mutante idéntica, sin embargo, luego de varios intentos no logró tener éxito.

Utilizamos entonces las mutantes que en principio modificaban aún más el reconocimiento de CREB a CRE-1 sin afectar la unión del receptor a hormona tiroidea (p766) o, afectando la unión de ambos (p767); la mutante 1808 carece del sitio CRE-2 al ser éste sustituido por CRE-1. Otra diferencia importante es el tipo celular utilizado. Mientras nuestro grupo estudió los factores endógenos de hipotálamo de rata, Harris utilizó un sistema heterólogo: células provenientes de riñón.

La secuencia consenso del Elemento de Respuesta a AMPc (TGACGTCA) fue identificada por primera vez en el gen de somatostatina por Montminy y Bilezikjian en 1987, desde entonces secuencias idénticas ó similares han sido identificadas en varios otros promotores incluyendo el del gen de TRH (Lee, *et al.*, 1988). Múltiples variaciones a la secuencia consenso han sido reportadas y como puede verse, el análisis *in silico* da resultados que no siempre son obtenidos experimentalmente. Se ha reconocido que varios factores pueden influir en la afinidad de la unión de la proteína CREB al DNA, por un lado la secuencia en la

cual el dinucleótido central CpG juega un papel importante (Schumacher, *et al.*, 2000), el tipo de homo u heterodímeros que se unen ya que hay varios tipos de CREB y ATFs, muchos de los cuales son célula-específico (Cha-Molstad *et al.*, 2004). Los mecanismos moleculares finos por los cuales CREB activado por AMPc actúa en la regulación de la transcripción génica siguen estando bajo discusión; por ejemplo, en algunas publicaciones se menciona que CREB se encuentra constitutivamente unido a las secuencias CRE (Sands y Palmer, 2008) mientras que otras aceptan que la interacción CREB-CRE no se produce sino hasta la fosforilación del factor transcripcional (Cha-Molstad, *et al.*, 2004), e inclusive algunas otras proponen una combinación de estas para explicar las diferencias tejido-específicas de la función de CREB ya que éste es un factor ubicuo (Carlezon Jr, *et al.*, 2005). Entre más se aleja el sitio CRE de la secuencia consenso, la necesidad de fosforilaciones, interacciones con otros factores del tipo SP1, etc., se vuelven esenciales. Nuestros resultados muestran un aumento en la actividad de luciferasa en respuesta a la activación de la PKA con forskolina por 4hrs y aún más por 6hrs. Esto se observó tanto en células de neuroblastoma SH-SY5Y como en la línea de origen glial C6. Como se mencionó, las neuroblastoma presentaban una respuesta débil y susceptibilidad al insulto de la transfección mostrando poca reproducibilidad. La utilización de una línea no neuronal nos permitía además acercarnos al sistema de Harris, de utilizar células en las cuales no se expresa el TRH en forma endógena. No utilizamos las células mas parecidas a Harris (HEK 293T) ya que la respuesta endógena no era adecuada y, como lo reportó este grupo, se hacía necesario co-transfectar a CREB, lo que pudiera opacar diferencias en la afinidad por el promotor.

De acuerdo a los datos *in silico*, la secuencia de la mutante p766 puede ser reconocida por CREB al igual que la secuencia silvestre, por lo que si el sitio CRE-1 es el mediador de la respuesta a AMPc cabría esperar que la respuesta al estímulo con el activador de PKA fuera igual, al menos a los tiempos cortos, que la de la silvestre. Sin embargo, los resultados muestran un aumento en la actividad, lo cual pudiera deberse a cierta estabilidad conferida por las secuencias aledañas (Deutsch, *et al.*, 1988), o la orientación dentro de la secuencia ya que esta mutante presenta la secuencia de la cadena complementaria.

En cambio, el plásmido p767 que no debe ser reconocido por CREB, no debería tener una respuesta a forskolina si fuese el sitio CRE-1 el responsable de la respuesta a AMPc. Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas entre la actividad del reportero del plásmido silvestre y el mutado, se observa la misma tendencia a aumentar la respuesta cuando se aumenta la incubación con forskolina, que implica que existe una

respuesta al activador de PKA aún si el sitio CRE-1 pudiera no ser reconocido por CREB.

En el caso del vector p1808 cuya secuencia del sitio CRE-2 está sustituida por la del sitio CRE-1 se esperaría que la actividad del reportero fuera la misma que la presentada en las células transfectadas con TRH-Luc si sólo el sitio original es funcional o inclusive mayor si ambos sitios CRE-1 son funcionales. De acuerdo al análisis *in silico* del promotor, el CRE-1 original (-59/-52) es reconocido por CREB, en cambio la secuencia CRE-1 insertada en el lugar del sitio CRE-2 (-101/-94) no; se esperaría entonces que la actividad en respuesta a la forskolina fuera similar al plásmido silvestre ya que ambos son reconocidos por CREB en el CRE-1 original. Los resultados muestran que la respuesta del vector mutante es significativamente menor que la del vector silvestre, tanto en condiciones basales como estimuladas. Esto indica que la presencia de dos sitios CRE-1 en el promotor de TRH no es suficiente para alcanzar los niveles de actividad obtenidos en un promotor con un sitio CRE-2 intacto y en cambio, apoyan a CRE-2 como el elemento de respuesta a AMPc aún en células no neuronales transfectadas.

En conjunto nuestros resultados muestran que el mantenimiento de la actividad del promotor de TRH en respuesta al estímulo de forskolina no depende del sitio CRE-1 ya que al mutarlo, no se interfiere con la respuesta del promotor. Por tanto, el sitio CRE-2 es el responsivo a la activación de la transcripción producida por un activador de la PKA.

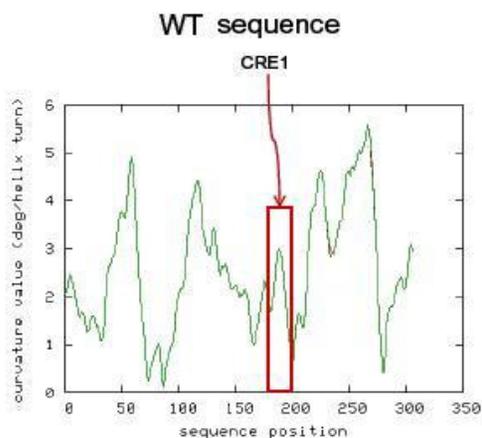
El sitio CRE-1 fue originalmente reconocido, tanto en cultivos heterólogos como en células hipotalámicas, como el sitio de reconocimiento del receptor de hormonas tiroideas; este sitio (AGGTCA) se denominó sitio-4 y es el sitio de regulación negativa por T3 (Hollenberg, *et al.*, 1995; Satoh, *et al.*, 1996; Díaz-Gallardo *et al.*, 2010a). Si bien se sugirió que existía una competencia entre CREB y TR por este sitio, el conjunto de nuestros resultados (esta tesis y Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010a, 2010b) descarta esta opción.

De acuerdo a lo aquí presentado, mutaciones en el sitio CRE-1 que disminuyen o eliminan su posible reconocimiento por CREB (p766 y p767) no interfieren con la respuesta del promotor al AMPc, mientras que cuando se encuentran presentes dos sitios CRE-1 (p1808) ni siquiera se reproduce la respuesta obtenida con el vector silvestre. En conclusión, en un sistema de células gliales (C6) transfectadas, la respuesta del promotor de TRH al AMPc no se encuentra mediada por el sitio CRE-1. Queda por estudiar los efectos de la incubación con T3 de células transfectadas con estos plásmidos para verificar que la mutación que elimina la interacción de TR con el sitio THRE (p767) impide el efecto inhibitorio de T3 y cuando el sitio permanece intacto y es reconocido por TR (p1808) sí se obtiene tal inhibición. Es necesario

sin embargo optimizar el ensayo para reproducir la inhibición ocasionada por T3 en el promotor silvestre como se ha reportado con anterioridad para lo cual habrá que estudiar condiciones distintas de las empleadas en este trabajo, por ejemplo, suero sin hormona tiroidea, etc. (Hollenberg, *et al.*, 1995; Satoh, *et al.*, 1996, 1999).

En un intento de explicar el por qué de los resultados con la mutante TAAAATCA de Harris, se hizo un análisis *in silico* (MUTACURVE; análisis realizado por Ana Gutiérrez, estudiante del Dr. Enrique Merino, Instituto de Biotecnología, UNAM) de la curvatura del DNA, que se sabe juega un papel esencial en la transcripción génica (Olivares-Zavaleta, *et al.*, 2006). El análisis de la curvatura de las secuencias tanto silvestre como mutada, demostró cambios en la curvatura de la mutante comparada con la silvestre en un rango de más de 50 bases (figura 17). Los resultados de este análisis permiten suponer que probablemente la inhibición de la expresión del gen de TRH obtenida por Harris se deba al cambio en la curvatura del DNA ocasionada por la presencia de adeninas en cadena que cause un impedimento al acceso al sitio a la RNA polimerasa misma, lo cual explicaría el por qué el Dr. Osuna no logró fabricar la misma mutante. Una estrategia posible para descartar que este fenómeno esté sucediendo es la elaboración de mutantes con adeninas en cadena, mediante otra técnica, o bien, colocar las adeninas adyacentes al sitio CRE-1; si la respuesta al AMPc y la expresión basal son abatidas podría suponerse que esto sería debido al cambio en la curvatura y no a la incapacidad de CREB-P de reconocer al sitio.

a)



b)

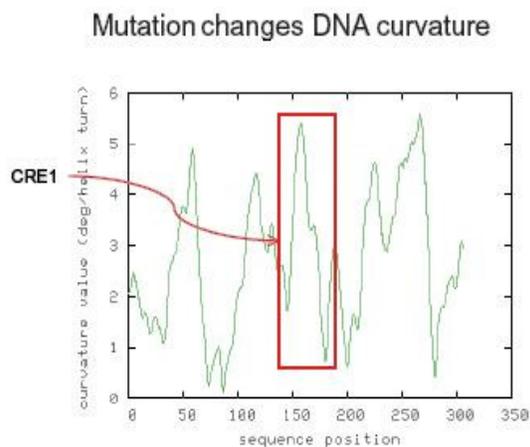


Figura 17. Análisis *in silico* de la curvatura del DNA. Cuando la secuencia del sitio CRE-1 (TGACCTCA) es sustituida por la secuencia TAAAATCA, la curvatura teórica del DNA cambia drásticamente. a) curvatura de la secuencia silvestre; b) curvatura de la secuencia mutante. Análisis realizado por Ana Gutiérrez con el software MUTACURVE.

Conclusiones

El objetivo de este trabajo fue contribuir a la obtención de más información acerca del papel que juega el sitio CRE-1 en la regulación del gen de la hormona liberadora de tirotropina en respuesta al AMPc. Luego del trabajo aquí expuesto se puede sugerir que la respuesta del promotor de TRH al AMPc no se encuentra mediada por el sitio CRE-1. Trabajos paralelos en nuestro grupo han empezado a corroborar la participación del sitio CRE-2 del promotor de TRH como mediador de la respuesta a AMPc (Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010a, 2010b; Barrera-Dircio, 2010).

Perspectivas

Si bien hemos demostrado la participación preferencial del sitio CRE-2 en la respuesta al AMPc, queda por corroborar la participación del sitio CRE-1, el cual se sobrepone al sitio THRE, en la inhibición por T3 empleando las construcciones aquí descritas.

Existe la posibilidad de que CREB-P pueda interactuar con otros factores de transcripción que pudieran estar ayudando a su estabilización ya que hay secuencias flanqueando al sitio CRE-2 que pueden ser reconocidas por el factor SP1, por lo que la regulación fina del gen de TRH por AMPc podría estar dada por la interacción de estos factores, así que el empleo de construcciones que presenten mutaciones en estos sitios del promotor nos proporcionaría más información acerca de la regulación transcripcional del gen.

Bibliografía

- Akil, H., Campeau, S., Cullinan, W. E., Lechan, R. M., Toni, R., Watson, S. J., Moore, R. Y. 2003. Neuroendocrine systems I: Overview - Thyroid and adrenal axes. En: Squire, L. R., Bloom, F. E., McConnell, S. K., Roberts, J. L., Spitzer, N. C., Zigmond, M. J. (Eds). *Fundamental neuroscience*. 2da ed. Academic Press. California, U.S.A.
- Arancibia, S., Rage, F., Astier, H., Tapia-Arancibia, L. 1996. Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology*. 64(4):257-267.
- Balkan, W., Tavianini, M. A., Gnokos, 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(1):252-259.
- Barrera-Dircio, B. 2010. Papel de la proteína de unión al elemento de respuesta al cAMP (CREB) y del elemento de respuesta al cAMP 2 (CRE-2) en la regulación transcripcional del gen de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Bear, M. F., Connors, B. W., Paradiso, M. A. 2001. *Neuroscience: Exploring the brain*. 2da ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
- Boler, J., Enzmann, F., Folkers, K., Bowers, C.Y., Shally, A.V. 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyro-glutamyl-histidil-proline amide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 37(4):705-710.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72:248-254.
- Brasier, A. R., Fortin, J. J. 1995. Nonisotopic assays for reporter gene activity. *Current Protocols in Molecular Biology*. 9.7.12-9.7.21.
- Bruhn, T. O., Bolduc, T. G., Rondeel, J. M. M. 1994. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. *Endocrinology*. 134(2):821-825.
- Bulant, M., Ritcher, K., Kuchler, K., Kreil, G. 1992. A cDNA from brain of *Xenopus Levis* coding for a new precursor of thyrotropin-releasing hormone. *FEBS Letters*. 296(3):292-296.
- Burgus, R., Dunn, T. F., 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.
- Carlezon Jr, W. A., Duman, R. S., Nestler, E. J. 2005. The many faces of CREB. *Trends in Neuroscience*. 28(8):436-
- Cha-Molstad, H., Keller, D. M., Yochum, G. S., Impey, S., Goodman, R. H. 2004. Cell-type-specific binding of the transcription factor CREB to the cAMP-response element. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 101(37):13572-13577.
- Cooper, E., Spaulding, S. W. 1985. Hormonal control of the phosphorylation of histones, HMG proteins and other nuclear proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 39:1-20.
- 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.
- Dahlmann-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. *The Journal of Biological Chemistry*. 266(5):3107-3112.
- Díaz-Gallardo, M. Y., Cote-Vélez, A., Carreón-Rodríguez, A., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. 2010a. Phosphorylated cyclic-AMP-response element-binding protein and thyroid hormone

receptor have independent response elements in the rat thyrotropin-releasing hormone promoter: an analysis in hypothalamic cells. *Neuroendocrinology*. 91:64-76.

Díaz-Gallardo, M. Y., Cote-Vélez, A., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. 2010b. A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signaling in hypothalamic neurons prevents binding of pCREB and GR at the CRE-like and composite GRE sites of TRH gene promoter. *Journal of Neuroendocrinology*. En prensa.

Deutsch, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L., Lin, J.C., Habener, J.F. 1988. Structural determinants for transcriptional activation by cAMP-responsive DNA elements. *Journal of Biological Chemistry*. 263(34):18466-18472.

Goya, L., Timiras, P. S. 1991. Characterization of Nuclear T3 Receptors in Human Neuroblastoma Cells SH-SY5Y: Effect of Differentiation with Sodium Butyrate and Nerve Growth Factor. *Neurochemical Research*. 16(2):113-116.

Grimes, C. A., Jope, R. S. 2001. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 β and facilitated by lithium. *Journal of Neurochemistry*. 78(6):1219-1232.

Grosvenor, C. E., Mena, F. 1980. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology*. 107(4):863-868.

Haisenleder, D. J., Ortolano, G. A., Dalkin, A. C., Yasin, M., Marshall, J. C. 1992. Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology*. 130(5):2917-2923.

Harris, M., Aschkenasi, C., Elias, C. F., Chandrankunnel, A., Nillni, E. A., Bjorbaek, C., Elmquist, J. K., Flier, J. S., Hollenberg, A. N. 2001. Transcriptional regulation of the thyrotropin-releasing hormone gene by leptin and melanocortin signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 107(1):111-120.

Hollenberg, A. N., Monden, T., Flynn, T. R., Boers, M., Cohen, O., Wondisford, F. E. 1995. The human thyrotropin-releasing hormone is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative response elements. *Molecular Endocrinology* 9:540-550.

Iversen, E. 1995. Thyrotropin releasing hormone. Occurrence and role outside the central nervous system. *Danish Medical Bulletin*. 42(3):257-268.

Joseph-Bravo, P., de Gortari, P. 2007. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. En: Rebolledo, F., López-Munguía, A. (Eds.). *Una ventana al quehacer científico*. Instituto de Biotecnología/DGDC-UNAM. México. Disponible en internet desde http://www.ibt.unam.mx/server/PRG.base?alterno:0,clase:dummy,edi:d,tit:-,tipo:doc,dir:libros_25aniv.html

Joseph-Bravo, P., Cote-Vélez, A., Pérez-Martínez, L. 2006. Integration of neuroendocrine signals that regulate the activity of hypophysiotropic peptides. En: Joseph-Bravo, P. *Molecular Endocrinology*. Kerala, India. Research Signpost.

Kakucska, I., Qi, L., Lechan, R. M. 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 136:2795-2802.

Kamman, M., Laufs, J., Schell, J., Groneborn, B. 1989. Rapid insertional mutagenesis of DNA by polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Research*. 17(13):5404.

Koller, K. J., Wolf, R. S., Warden, M. K., Zoeller, R. T. 1987. Thyroid hormone regulates levels of thyrotropin-releasing hormone mRNA in the rat paraventricular nucleus. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 84:7329-7333.

Lechan, R. M., Fekete, C. 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Progress in Brain Research*. 153:209-235.

Lechan, R. M., Wu, P., Jackson, I. M. D., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., Goodman, R. H. 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*.

231: 159-161.

Lee, S. L., Stewart, K., Goodman, R. H. 1988. Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone. *The Journal of Biological Chemistry*. 263(32):16604-16609.

Luo, L. G., Bruhn, T. O., Jackson, I. M. D. 1995. Glucocorticoids stimulate thyrotropin-releasing hormone gene expression in hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 136:4945-4950.

Montminy, M. y Bilezikjian, L. M. 1987. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene. *Nature*. 328:175-178.

Nilni, E. A., Sevarino, K. A. 1999. The Biology of pro-thyrotropin-releasing hormone-derived peptides. *Endocrine Reviews*. 20(5):599-648.

Olivares-Zavaleta, N., Jauregui, R., Merino, E. 2006. Genome analysis of *Escherichia coli* promoter sequences evidences that DNA static curvature play a more important role in gene transcription than has previously been anticipated. *Genomics*. 87(3):329-337.

Ortiz-Caro, X., Yusta, B., Montiel, F., Villa, A., Aranda, A., Pascual, A. 1986. Identification and characterization of triiodothyronine receptors in cells of glial and neuronal origin. *Endocrinology*. 119: 2163-2167.

Pahlman, S., Ruusala, A., Abrahamsson, L., Mattson, M. E. K., Esscher, T. 1984. Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol-ester-induced differentiation. *Cell Differentiation*. 14:135-144.

Pérez-Martínez, L., Carreón-Rodríguez, A., González-Alzati, M. E., Morales, C., Charli, J. L., Joseph-Bravo P. 1998. Dexametasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology*. 68:345-354.

Reichlin, S. 1998. Neuroendocrinology. En: Wilson, J. D., Foster, D. W., Kronenberg, H. M., Larsen, P. R. (Eds.) *Williams Textbook of Endocrinology*. W. B. Saunders Company.

Ritcher, 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(3):617-621.

Rosethorne, E., Nahorski, S. R., Challiss, R. A. J. 2008. Regulation of cyclic AMP response-element binding-protein (CREB) by G_q/11-protein-coupled receptors in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Biochemical Pharmacology*. 75(4-3):942-955.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor. USA.

Sánchez, E., Uribe, R. M., Corkidi, G., Zoeller, R. T., Cisneros, M., Zacarias, M., Morales-Chapa, C., Charli, J. L., Joseph-Bravo, P. 2001. Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*. 74:407-422.

Sands, W. A., Palmer, T. M. 2008. Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cellular Signalling*. 20(3):460-466.

Satoh, T., Yamada, M., Iwasaki, T., Mori, M. 1996. Negative regulation of the gene of preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone. *Journal of Biological Chemistry*. 271:27919-27926.

Schumacher, M.A., Goodman, R.H., Brennan, R. G. 2000. The structure of a CREB bZIP-somatostatin CRE complex reveals the basis for selective dimerization and divalent cation-enhanced DNA binding. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(45):35242-35247.

Segersen, T. J., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H. J., Wu, P., Jackson, I. M. D., Lechan, R. M. 1987a. Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*. 121:98-107.

Segersen, T. J., Kauer, J., Wolfe, H. C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I. M. D., Lechan, R. M.

1987b. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*. 238:78-80.

Tavianini, M. A., Gnokos, P. J., Lampe, T. H., Roos, B. A. 1989. Dexamethasone stimulates thyrotropin-releasing hormone production in a C cell line. *Molecular Endocrinology*. 3(4):605-610.

Trentin, A. G., Alvarez-Silva, M. 1998. Thyroid hormone regulates protein expression in C6 glioma cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 31:1281-1284.

Uribe, R.M., Redondo, J.L., Charli, .JL., Joseph-Bravo, P. 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 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. *Journal of Endocrinology*. 186(2):387-396.

Wallukat, G. 2002. The beta-adrenergic receptors. *Herz*. 27(7):683-690.

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

Yamada, M., Radovick, S., Wondisford, F. E., Nakayama, Y., Weintraub, B. D., Wilber, J. F. 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human preprothyrotropin-releasing hormone. *Molecular Endocrinology*. 4:551-555.

Yang, I.M., Lin, A., Lee, S.L. CREB binding to variant cAMP responsive elements (CREs) in the rat TRH gene (abstract) San Antonio, 75th Annual Meeting of the Endocrine Society, 1992.

Yaniv, S. P., Ben-Shachar, D., Klein, E. 2008. Norepinephrine–glucocorticoids interaction does not annul the opposite effects of the individual treatments on cellular plasticity in neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*. 596:14-24.

Zhang, J., Sutachan, J., Montoya-Gacharna, J., Xu, C., Xu, F., Neubert, T. A., Recio-Pinto, E., Blanck, T. J. J. 2009. Isoflurane inhibits cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein phosphorylation and calmodulin translocation to the nucleus of SH-SY5Y cells. *Anesthesia & Analgesia*. 109(4):1127-1134.

Zoeller, R. T., Tan, S. W., Tyl, R. W. 2007. General background on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) axis. *Critical Reviews in Toxicology*. 37:11-53.

Abreviaturas.

8Br-AMPC: 8-bromo-adenosin-monofosfato cíclico.

AMPC: 3'5'-adenosin-monofosfato-cíclico.

AP-1: Proteína activadora 1.

beta-gal: Beta galactosidasa.

BSA: Albúmina sérica bovina.

CRE: Elemento de respuesta a AMPC.

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta AMPC.

CREB-P: CREB fosforilado.

db-AMPC: Dibutilil-adenosin-monofosfato cíclico.

dex: Dexametasona.

DMEM: Dulbeccos Modified Eagle's Medium.

DNA: Ácido desoxiribonucleico.

FBS: Suero fetal bovino.

Forsk: Forskolina.

GR: Receptor de glucocorticoides.

GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides.

Luc: Luciferasa.

NPV: Núcleo paraventricular.

ONPG: orto-nitrofenil-β-galactosida.

PBS: Amortiguador de fosfatos salinos.

PKA: Proteína cinasa A.

RLU: unidades relativas de luz.

RNA_m: Acido ribonucleico mensajero.

S-DMEM: Dulbeccos Modified Eagle's Medium Suplementado.

T₃: triyodotironina.

TH: Hormonas tiroideas.

THRE: Elemento de respuesta a hormona tiroidea.

TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

TR: Receptor de hormona tiroidea.

TRH: Hormona liberadora tirotrópica.

Anexo

Preparación de soluciones

Preparación de 500mL de solución de Hank:

1. Cloruro de sodio (NaCl) 4g
2. Cloruro de potasio (KCL) 0.2g
3. Fosfato de potasio (KH_2PO_4) 0.2g
4. Fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 0.045g
5. D-(+)- glucosa 0.50g
6. Mezclar y aforar con agua estéril a 500mL

Preparación de 1000mL de solución PBS 1x:

1. Cloruro de potasio (KCL) 0.20g
2. Fosfato de potasio (KH_2PO_4) 0.195g
3. Cloruro de sodio (NaCl) 8.12g
4. Fosfato de sodio (NaH_2PO_4) 0.97g
5. Disolver y aforar con agua estéril a 1000 mL

Preparación de 100mL de solución fosfato de sodio 0.1M, pH 7.5:

1. Na_2HPO_4 0.2M 41 mL
2. NaH_2PO_4 0.2M 9 mL
3. Agua bidestilada 50 mL
4. Ajustar en potenciómetro a pH 7.5

Preparación de 10 mL de solución 100x Mg:

1. MgCl_2 1M 1 mL
2. beta-mercaptoetanol 4.5M 3.125 mL
3. Agua bidestilada 5.875 mL

Preparación de 20 mL de ONPG 1x (4mg/mL):

1. ONPG 80 mg
2. Aforar a 20 mL con solución de fosfato de sodio 0.1M, pH 7.5