



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y FISIOLÓGICA MOLECULAR

**LA TRIIODOTIRONINA (T3) REGULA DIFERENCIALMENTE
LA EXPRESIÓN DE TRH EN NEURONAS HIPOTALÁMICAS EN
DESARROLLO *IN VITRO***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA EL MAESTRO EN CIENCIAS

Alfonso Carreón Rodríguez

DIRECTORA DE TESIS: **DRA. LEONOR PEREZ MARTINEZ**



CUERNAVACA, MORELOS

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.

Este trabajo se desarrolló bajo la dirección de la Dra. Leonor Pérez Martínez, en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México y se financió parcialmente con los donativos CONACYT (61208) y DGAPA-UNAM (IN227506-3; IN224909)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dr. Enrique Salas Vidal

Dra. Claudia Lydia Treviño Santacruz

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Presidente Dra. Marcia Hiriart Urdanivia

Secretario Dr. Iván Velasco Velázquez

Vocal Dra. Lourdes Massieu Trigo

Suplente Dra. Leda Carolina Torres Maldonado

Suplente Dra. Leonor Pérez Martínez

*"Mas allá de la ley, mas allá del honor, mas allá
de la patria, está la verdad que debe prevalecer
por encima de todo"*

Justo Sierra

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A Dios

Te agradezco por cada latido y cada respiro, y te dedico cada pensamiento y cada acción

A mis padres

Simplemente porque sin ustedes el maravilloso sueño de vivir, no hubiera sido posible para mí

A mi hermosa emperatriz Mónica Viviana

Por tu amor, por tu comprensión, por tu apoyo incondicional, por tu paciencia, por tu compañía, por nuestra familia, por nuestras hijas, porque te admiro en fin por tantas cosas, pero por sobre todo ello porque eres el amor de vida y yo tu caballero andante

A mis hermosas princesitas Jacqueline Vivianne y Claudia Andrea

Porque ustedes son el más hermoso regalo que Dios me ha dado y quiero esforzarme cada día por ser mejor, para ser digno de ese regalo

A la Dra. Pérez Martínez mi mentora. A Leonor mi amiga

Porque con tu inteligencia y talento me has enseñado a distinguir la diferencia entre un trabajo y una vocación, pero con tu calidad humana me has dado el aliento para que el camino entre uno y otro valga la pena el esfuerzo

A la Dra. Patricia Joseph Bravo y al Dr. Jean Louis Charli Casalonga

Por su generosidad al haberme acogido durante tantos años en su grupo. Por ser líderes y maestros de quienes he obtenido grandes lecciones de vida

A Fer, Fredy y Ofelinga Tinguilín

Porque sigo viviendo con ustedes en el País de Nunca Jamás

A la Sra. Marilú y a Loli

Por ser mis ángeles especiales

A todos mis amigos y compañeros en esta etapa con quienes he compartido gratos momentos, y quienes me han brindado su amistad, sus enseñanzas, su apoyo y compañía. En especial a los doctores Gustavo Pedraza, Magda Guerra, Edith Sánchez, Gonzalo Aranda, Lucía Chávez, Isel Pascual, Victor Rivelino, David Hernández, Rocío Rodríguez así como a Daniela Rebolledo, Miriam Martínez, Carlos Pérez, Manuel Villa, Doña Elena, Fidelia Romero, Miguel Cisneros, Carla Contreras y Elizabeth Mata

Al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

Por haber sido mi escuela, mi casa, mi espacio por tantos años. Gracias por haber forjado en mí el corazón azul y la piel dorada

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE TABLAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
NEUROGÉNESIS.....	3
HIPOTÁLAMO	6
TRH.....	9
Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT)	9
Ontogenia	10
Señales que regulan la expresión de TRH.....	11
HORMONAS TIROIDEAS Y SISTEMA NERVIOSO.....	14
RECEPTORES TIROIDEOS.....	20
JUSTIFICACION	26
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y METODOS	30
Animales	30
Cultivo celular	30
Inmunoblot	31
RT-PCR semicuantitativa.....	32
Presentación de datos	33
RESULTADOS	34

Regulación de la expresión del RNAm de TRH por efecto de T3 en función del estadio de desarrollo in vitro	34
Regulación de la expresión del RNAm de TR β 2 durante el desarrollo in vitro.....	35
Regulación de la expresión del RNAm de TR α 1 y TR β 2 por efecto de T3 durante el desarrollo in vitro	37
Regulación de la expresión del RNAm de TRH por T3 en función de la presencia de suero in vitro	37
Regulación de la expresión del RNAm y de las proteínas de los receptores tiroideos durante la ontogenia hipotalámica	39
Respuesta del RNAm de TAU al efecto de T3 in vitro.....	42
Respuesta del RNAm de CRH al efecto de T3 in vitro.....	42
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	50
PERSPECTIVAS	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS.....	62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos generales de neurogénesis en el sistema nervioso central.....	6
Figura 2. Hipotálamo.....	8
Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.....	10
Figura 4. Ontogenia de células TRHérgicas.....	11
Figura 5. Factores de transcripción que participan en el desarrollo del fenotipo neuroendocrino...	12
Figura 6. Señales extracelulares que participan en el desarrollo del fenotipo TRHérgico.....	14
Figura 7. Metabolismo y funciones de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso.....	16
Figura 8. Ejemplos de regulación del desarrollo por hormonas tiroideas sobre algunas regiones del sistema nervioso.....	19
Figura 9. Efectos de las hormonas tiroideas en el desarrollo hipotalámico.....	20
Figura 10. Estructura y funciones de los receptores tiroideos.....	23
Figura 11. Ventanas críticas en el desarrollo del sistema nervioso para la acción de las hormonas tiroideas.....	27
Figura 12. T3 reguló la expresión de RNAm de TRH de acuerdo al estadio del desarrollo del cultivo celular hipotalámico.....	35
Figura 13. Los transcritos de receptores de hormona tiroidea estuvieron presentes en las células hipotalámicas en cultivo pero solamente el transcrito de TRβ2 fue regulado en el desarrollo.....	36
Figura 14. Los transcritos de TRα1 y TRβ2 se regularon positivamente por T3 en cultivos de células hipotalámicas	37
Figura 15. El 17β-estradiol reprimió el efecto de T3 sobre los niveles de RNAm de TRH en cultivos primarios de células hipotalámicas en medio libre de suero.....	39
Figura 16. Los transcritos y proteínas de receptores de hormona tiroidea fueron regulados durante la ontogenia hipotalámica.....	41
Figura 17. Respuesta de RNAm de TAU a T3 en cultivos hipotalámicos inmaduros.....	42
Figura 18. Respuesta de RNAm de CRH a T3 en cultivos hipotalámicos inmaduros.....	43
Figura 19. Modelo de inducción de TRα1 dependiente de T3 sobre la expresión de TRH y TRβ2.49	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de la mutación nula de los genes de receptores tiroideos sobre el eje tiroideo....	25
Tabla 2. Parámetros utilizados para la amplificación de DNA por PCR.....	32
Tabla 3. Elementos putativos de respuesta a hormona tiroidea y estrógenos en el promotor de TR β 2 en mamíferos.....	45

ABREVIATURAS

ADHD	Attention-Deficit Hyperactivity Disorder, <i>trastorno por déficit de atención e hiperactividad</i>
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
Bcl	B-cell lymphoma, <i>linfoma de células B</i>
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor, <i>factor neurotrópico derivado del cerebro</i>
bHLH	basic Helix Loop Helix
BMP	Bone Morphogenetic Protein, <i>proteína morfogenética de hueso</i>
CRH	Corticotropin Releasing Hormone, <i>hormona liberadora de corticotropina</i>
DA	Dopamine, <i>dopamina</i>
DIV	Days <i>In Vitro</i> , <i>días in vitro</i>
DNA	DeoxyriboNucleic Acid, <i>ácido desoxirribonucleico</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, <i>medio de Eagle modificado de Dulbecco</i>
E	Embryonic, <i>embrionario</i>
EGF	Epidermal Growth Factor, <i>factor de crecimiento epidérmico</i>
ERE	Estrogen Response Element, <i>elemento de respuesta a estrógenos</i>
ES	Embryonic Stem, <i>célula troncal embrionaria</i>
FBS	Fetal Bovine Serum, <i>suero bovino fetal</i>
FGF	Fibroblast Growth Factor, <i>factor de crecimiento fibroblástico</i>
Fox	Forkhead box
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, <i>proteína ácida fibrilar glial</i>
GHRH	Growth Hormone Releasing Hormone, <i>hormona liberadora de la hormona de crecimiento</i>
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone, <i>hormona liberadora de gonadotropinas</i>
Hes	Hairy/Enhancer of split
KLF	Krüppel-Like Factor, <i>factor tipo Krüppel</i>
LTP	Long Term Potentiation, <i>potenciación a largo plazo</i>
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase, <i>proteína cinasa activada por mitógenos</i>
MBP	Myelin Basic Protein, <i>proteína</i>
MCT	MonoCarboxylate Transporter, <i>transportador de monocarboxilatos</i>
MeHg	Monomethylmercury, <i>monometilmercurio</i>
NCAM	Neural Cell Adhesion Molecule, <i>molécula de adhesión celular neural</i>
NcoR	Nuclear receptor Corepressor, <i>correpresor de receptor nuclear</i>
NT	Neurotrophin, <i>neurotrofina</i>

OT	Oxytocin, <i>oxitocina</i>
PCB	PolyChlorinated Biphenyls, <i>bifenilos policlorados</i>
POMC	Pro-Opio Melano-Cortin, <i>pro-opio melanocortina</i>
PKA	Protein Kinase A, <i>proteína cinasa A</i>
PVN	ParaVentricular Nucleus, <i>núcleo paraventricular</i>
pVN	PeriVentricular Nucleus, <i>núcleo periventricular</i>
RNA	RiboNucleic Acid, <i>ácido ribonucleico</i>
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, <i>transcripción reversa y reacción de la polimerasa en cadena</i>
sdg	Semanas de gestación
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, <i>electrophoresis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio</i>
Shh	Sonic Hedgehog
SMRT	Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors, <i>mediador de silenciamiento de receptors tiroideos y retinoicos</i>
SON	Supra Optic Nucleus, <i>núcleo supraóptico</i>
Sox	Sex determining region Y-box, <i>region de la caja Y determinante del sexo</i>
SRC	Steroid Receptor Coactivator, <i>coactivador de receptor esteroideo</i>
SS	Somatostatin, <i>somatostatina</i>
T3	Triiodotironine, <i>triyodotironina</i>
T4	Tetraiodotironine or Thyroxine, <i>tetrayodotironina o tiroxina</i>
TBS	Tris Buffered Saline
TGF	Transforming Growth Factor, <i>factor de crecimiento transformante</i>
TR	Thyroid Receptor, <i>receptor tiroideo</i>
TRE	Thyroid Response Element, <i>elemento de respuesta a hormona tiroidea</i>
TRH	Thyrotropin Releasing Hormone, <i>hormona liberadora de tirotropina</i>
TSH	Thyroid Stimulating Hormone, <i>hormona estimulante de la tiroides</i>
Trk	Tyrosine kinase, <i>tirosina cinasa</i>
VP	Vasopresin, <i>vasopresina</i>



RESUMEN

La neurogénesis se caracteriza por un período en donde las células progenitoras se comprometen con el linaje neuronal, seguido por un periodo de diferenciación terminal en donde maduran las características de identidad y función. Para ésto se requiere que las células sigan programas de diferenciación específicos conformados por la interacción de factores intracelulares y señales extracelulares. En el hipotálamo estos programas son particularmente importantes pues las células que lo conforman deben diferenciarse en fenotipos diversos para que esta región cumpla su función en el organismo como un organizador homeostático y coordinador de las funciones endocrinas. Estas células precursoras comparten en su nacimiento un mismo ambiente en el tiempo y el espacio que no explica por si mismo la diversidad neuronal generada. Nosotros nos hemos enfocado en el desarrollo de las células que producen TRH en el hipotálamo, que controlan la función del eje tiroideo, el cual se retroalimenta negativamente por su producto final que son las hormonas tiroideas: triiodotironina (T3) y tetraiodotironina (T4). La T3 juega un papel importante durante el desarrollo del sistema nervioso central. Los efectos de T3 sobre la expresión génica son determinados en parte por el tipo de receptores a hormona tiroidea expresados en un determinado tipo celular. Estudios previos han demostrado que la transcripción de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) en el hipotálamo adulto está sujeta a la regulación negativa por hormonas tiroideas. Sin embargo, el papel de T3 en la expresión de TRH durante el desarrollo es desconocido. En este estudio usamos cultivos primarios derivados de hipotálamo de fetos de rata de 17 días de gestación para analizar los efectos de T3 sobre la expresión génica. La T3 incrementó la expresión del RNAm de TRH en cultivos inmaduros, pero la disminuyó en cultivos maduros. Además, la T3 reguló positivamente la expresión del RNAm de los receptores tiroideos TR α 1 y TR β 2. La expresión de TR α 1 coincidió cronológicamente con la de TRH en el hipotálamo de la rata *in vivo*. Con base en estos resultados proponemos que la maduración de la expresión de TRH en el hipotálamo en desarrollo puede involucrar a T3 actuando a través de TR α 1.



ABSTRACT

Neurogenesis occurs in a period when stem cells are committed to the neuronal lineage followed by a period of terminal differentiation when they acquire those characteristics of identity and function. This process requires that cells follow specific differentiation programs shaped by the interaction of intracellular and extracellular signals. In the hypothalamus these programs are particularly important because cells within it must differentiate into diverse phenotypes so this region fulfills its function in the body as an organizer and coordinator of homeostatic endocrine functions. These cells share the same environment in time and space when they are born, what does not explain the neuronal diversity present in this region. We have focused on the development of TRH-producing cells in the hypothalamus that control the function of the thyroid axis, which is regulated by negative feedback through their final products, the thyroid hormones triiodothyronine (T3) and tetraiodothyronine (T4). T3 plays an important role during the development of central nervous system. The effects of T3 on gene expression are determined in part by the type of thyroid hormone receptors expressed in a particular cell type. Previous studies have shown that the transcription of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the adult hypothalamus is subject to negative regulation by thyroid hormones. However, the role of T3 on TRH expression during development is unknown. In this study, we used primary cultures from fetal rat hypothalamus of 17 days of gestation to analyze the effects of T3 on gene expression. T3 increased the expression of TRH mRNA on immature cell cultures, but decreased it on mature ones. In addition, T3 positively regulated mRNA expression of thyroid receptors TR α 1 and TR β 2. Expression of TR α 1 correlates in time with that of TRH in the hypothalamus of the rat *in vivo*. Based on these results it is proposed that the maturation of the TRH expression in the developing hypothalamus may involve T3 acting through TR α 1.



INTRODUCCIÓN

NEUROGÉNESIS

La neurogénesis es el proceso mediante el cual se originan los diversos circuitos que conformarán la complejidad del sistema nervioso y se caracteriza por programas coordinados de señales que determinan el destino espacio-temporal de las neuronas, así como su fenotipo final.

Inicialmente las células troncales o progenitoras que darán origen a las futuras neuronas deben transitar por un período de "nacimiento" mediante el cual son expuestas a diversas clases y concentraciones de estímulos extracelulares que modulan sus programas transcripcionales para determinar un tipo celular particular, lo que las transforma primero en precursores neurales, es decir células con capacidad proliferativa pero comprometidas para generar uno o varios linajes celulares.

La expresión de genes proneurales en este momento es crítica para que las células precursoras entren en la fase quiescente G0 del ciclo celular, con lo cual dejan de proliferar y comienzan a expresar marcadores pan-neuronales estableciendo el fenotipo neuronal. En este momento las células entran a la fase quiescente G0 durante la cual dejan de proliferar. Además dichos genes proneurales contribuyen a la diferenciación induciendo la formación de sinapsis, el desarrollo de actividad eléctrica pero fundamentalmente la síntesis y secreción de un producto específico para cada tipo neuronal y para ello se requiere además la coordinación con programas de diferenciación para cada neurona mediante la activación y represión de genes específicos modulados a través de una compleja interacción de factores intrínsecos y señales extracelulares particulares de cada dominio de progenitores (Bertrand et al., 2002; Briscoe y Novitch, 2008; Pérez-Martínez y Charli, 2006).

Si tomamos como ejemplo el desarrollo de las células progenitoras de la región ventral del tubo neural, sabemos que dan lugar a la formación de las neuronas motoras del sistema nervioso (tanto si hablamos de neuronas motoras que inervan músculo esquelético o neuronas secretomotoras del sistema neuroendocrino) (Markakis, 2002). La determinación de la identidad y subtipos de las neuronas generadas depende de su posición en el dominio de progenitores de donde se originen a lo largo del tubo, en función de que cada subtipo expresa una combinación única de factores de transcripción, la cual responde de manera específica al gradiente de concentración de Sonic Hedgehog (Shh) generado por la notocorda y la placa del piso del tubo neural. Este gradiente actúa a su vez sobre un código de diferentes proteínas homeóticas y del tipo bHLH para dar origen a



diversos tipos neuronales (Briscoe et al., 2000) o a oligodendrocitos (Nery et al., 2001) en el sistema nervioso de vertebrados.

A través de Gli2 y Gli3 que son homólogos en vertebrados de la proteína Ci (cubitus interruptus) de *Drosophila*, Shh inhibe o estimula la expresión de proteínas clase I o II respectivamente estableciendo los límites ventrales y dorsales del tubo neural y dichas proteínas junto con los correpresores de la familia Groucho actúan a su vez como represores del desarrollo de ciertos fenotipos. Esta señalización inicial tipo Shh/Gli parece incidir en la organización espacial más que en la inducción de factores de transcripción de un dominio particular de progenitores. Otra señal que incide en los progenitores neurales además de Shh/Gli es el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) que al parecer cumple dos funciones: a) actuar como un inhibidor de la diferenciación neural manteniendo a las células en un estado de célula troncal y b) suprimir la expresión de moléculas de clase I y II evitando así la emergencia del patrón dorsoventral.

En contraposición a FGF, el ácido retinoico producido por estructuras adyacentes al tubo neural actuaría: a) atenuando los efectos proliferativos de FGF, b) induciendo la expresión de factores de transcripción en los progenitores neurales y en la diferenciación neural y c) participando en la segmentación dorsoventral a través de su habilidad para inducir la expresión de moléculas de clase I y por lo tanto compensando los efectos ventralizantes de Shh.

La Proteína Morfogenética de Hueso (BMP) es otra señal que se opondría a los efectos ventralizantes de Shh, al ser secretada por la línea media dorsal del tubo y estimular el carácter dorsal de los progenitores. Wnt también producida en la línea media dorsal promueve sobretodo la proliferación de los progenitores a lo largo del tubo neural y aparentemente inhibe la acción de Shh, y por ende el desarrollo de fenotipos ventrales.

Además de las señales mencionadas del ambiente sobre las células como es el caso de FGF, BMP y Wnt se requieren factores intrínsecos que participen en la inducción neural. Entre estos factores intrínsecos tenemos a Sox1-3, factores de transcripción como la caja del grupo de alta movilidad de la familia SoxB1 cuya expresión aparentemente responde a las señales neuralizantes mencionadas antes. La función de activadores transcripcionales de las proteínas SoxB1 al parecer involucran: a) la determinación del fenotipo neural y b) el mantenimiento del estado progenitor neural. Sox21 es un miembro de la familia SoxB1 pero con actividad transcripcional represora que se contrapone a la acción de Sox1-3.



Un paso crítico en la progresión de progenitores a neuronas diferenciadas es el inicio de la expresión de los genes proneurales bHLH. Los genes proneurales contribuyen a la salida de los progenitores del ciclo celular, así como a la especificación de características pan-neuronales tales como la formación de axones y dendritas, o la expresión de la proteína asociada a microtúbulos TAU (Aniello et al., 1991). Entre estos genes proneurales bHLH encontramos a: Mash1, Neurogenina1 y Neurogenina2 por mencionar algunos. Estas proteínas también se expresan en una forma restringida a un dominio de progenitores por lo que se considera que son capaces de responder también a las señales de segmentación en este caso Shh/Gli. Lo anterior sugiere que además de contribuir a los aspectos generales de la diferenciación neuronal, las proteínas bHLH también contribuyen en la especificación de tipos celulares específicos. Esta señalización por Shh, en casos como el del telencéfalo, regula inclusive el estímulo iniciado por Nodal, lo que sin embargo no ocurre en el caso del diencefalo (Rohr et al., 2001).

En el caso de las motoneuronas por ejemplo, su formación está coordinada en varios pasos por la expresión de Olig2, una proteína bHLH. La expresión de Olig2 comienza en el tubo neural en respuesta a Shh y ácido retinoico. Olig2 regula la expresión de otras bHLH como Neurogenina-2, NeuroM, etc. Algunos mecanismos como Notch que antagonizan la expresión de genes proneurales bHLH, pueden contribuir a mantener el estado de progenitor positivo a Olig2 e inducir la formación de glía. Notch activa la expresión de represores de bHLH de la familia Hes. La acción de Notch disminuye la neurogénesis con un incremento recíproco en el número de células troncales y progenitoras que se mantienen en fases tardías del desarrollo (**Fig. 1**).

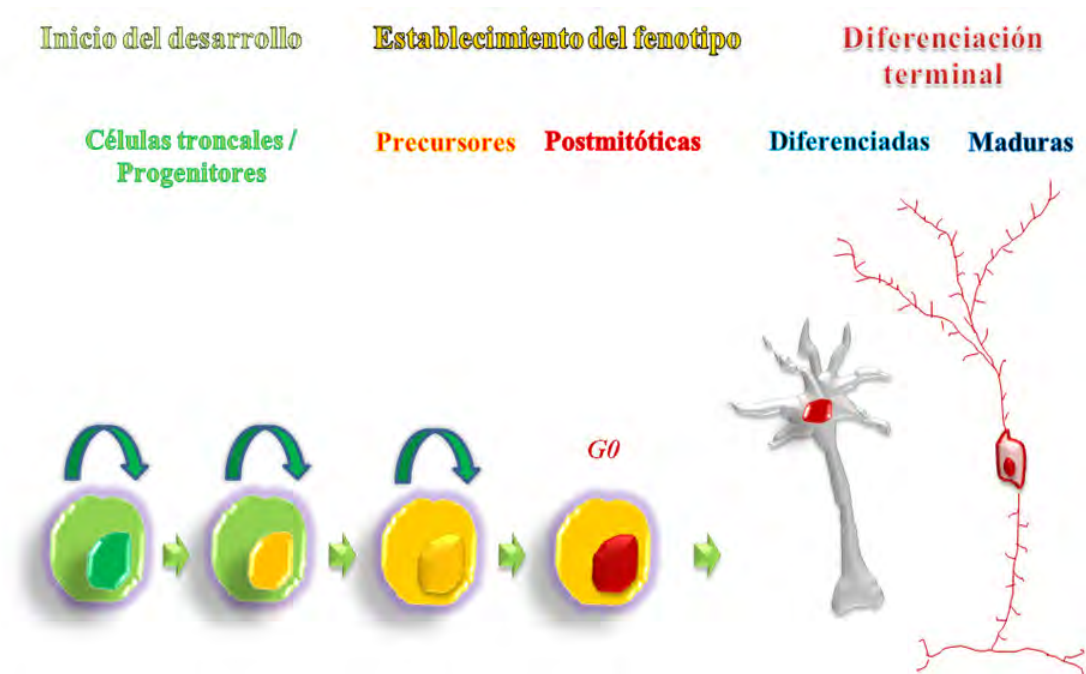


Fig. 1. Mecanismos generales de neurogénesis en el sistema nervioso central. Las células troncales del neuroepitelio progresivamente restringen su capacidad proliferativa y de diferenciación, pasando por los estadios de célula progenitora y precursor neural, lo que significa que se han comprometido en un linaje celular en particular. Después de la etapa de precursor las células salen del ciclo celular para entrar en una fase G0 en la cual pierden completamente su capacidad para reproducirse, estableciéndose en el fenotipo neuronal. Las células postmitóticas entran entonces en un proceso de diferenciación terminal que va desde la expresión de características generales como son la expresión de marcadores pan-neuronales, la presencia de neuritas, la actividad eléctrica, la formación de sinapsis, hasta la síntesis y secreción de un producto característico de cada fenotipo.

HIPOTÁLAMO

El hipotálamo en particular es un modelo de estudio muy interesante de neurogénesis, pues agrupa en diversos núcleos a un número variado de fenotipos que no obstante su coexistencia poseen diferentes programas de diferenciación durante el desarrollo (Perez-Martínez et al., 1998). Esto es necesario para generar una rica diversidad neuronal dado que el hipotálamo es un integrador de procesos homeostáticos de varias regiones del organismo, requeridos para la supervivencia de los vertebrados. Está conformado por los núcleos que sintetizan y secretan los siguientes factores: hormona liberadora de corticotropina (CRH), dopamina (DA), hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), somatostatina (SS) y hormona liberadora de tirotropina (TRH) que son responsables de regular la síntesis y secreción de las hormonas de la glándula pituitaria. Esta glándula por su parte sintetiza y libera hormonas que regulan las funciones de diversos órganos endocrinos.



A partir de la vesícula que forma el cerebro anterior, se originan el telencéfalo y el diencefalo y de este último se desarrolla el hipotálamo. Las vías de señalización de Nodal y Hedgehog influyen en la segmentación dorsoventral en todos los niveles axiales del sistema nervioso central. En zebrafish la señalización por Nodal es requerida para la inducción de los genes homeóticos *nk2.1a* en el diencefalo ventral y *nk2.1b* en el telencéfalo ventral. La señalización por Shh es también requerida para la expresión telencefálica de *Nk2.1b* pero puede no ser esencial para establecer la expresión diencefálica de *Nk2.1a*. Además Shh no restaura la expresión telencefálica de *Nk2.1b* en la ausencia de actividad de Nodal sugiriendo que la señalización por Shh actúa corriente debajo de la actividad de Nodal para segmentar el telencéfalo ventral. Por lo tanto la vía de Nodal regula la segmentación del cerebro anterior ventral a través tanto de mecanismos dependientes como independientes de Shh (Rohr et al., 2001).

La remoción de factores exógenos de segmentación tales como FGF, BMP, Wnt o Nodal durante los pasos de diferenciación temprana induce la generación de progenitores rostrales de tipo hipotalámico (Rax+/Six3+/Vax1+). En lugar de la adición de señales inductivas, la minimización de la señalización exógena de segmentación juega un papel clave en la especificación hipotalámica rostral de progenitores neurales derivados de células pluripotenciales (Wataya et al., 2008).

El hipotálamo es un derivado de la placa embrionaria basal que no exhibe neurogénesis postnatalmente, aunque se han aislado células progenitoras de esta región. Los precursores neurales cultivados del hipotálamo de ratas de 7 días de nacidas dieron origen a neuronas capaces de sintetizar neuropéptidos. Las neuronas derivadas de las células progenitoras del hipotálamo se compararon con las células derivadas de los progenitores de cultivos de hipocampo, que es un derivado de la placa embrionaria alar que mantiene la neurogénesis *in vivo* en la etapa adulta; Dicha comparación se realizó, tomando en consideración que en etapa adulta ambas regiones están pobladas con tres diferentes categorías celulares: a) células Categoría I que son generadas tanto en el hipocampo como en el hipotálamo y que son positivas para CRH y SS; b) células Categoría II que son generadas en el hipotálamo pero no en el hipocampo y son positivas para DA, GHRH, TRH, OT o VP, y c) células Categoría III que son generadas en la placa olfatoria, migran al hipotálamo y son positivas para GnRH. Los cultivos tanto de hipocampo como de hipotálamo produjeron poblaciones que dieron origen a las tres categorías sugiriendo que ambos contenían progenitores inmaduros con suficiente plasticidad para desarrollar fenotipos usualmente inhibidos *in vivo* por el microambiente local respectivo, ya sea hipotalámico o hipocampal. (Markakis et al., 2004) (**Fig.2**).

Poco se conoce acerca de los procesos que subyacen la neurogénesis y especificación de las neuronas de los núcleos hipotalámicos ventrales, arcuato y ventromedial. El gen proneural *Mash1* es expresado a través del neuroepitelio retroquiasmático basal y la pérdida de *Mash1* resulta en hipoplasia de los núcleos arcuato y ventromedial. Estos defectos son debidos a una falla de neurogénesis y mayor apoptosis, defectos que puede ser rescatados por *Ngn2* ectópica bajo el control del promotor de *Mash1*. Además de su papel en la neurogénesis, *Mash1* también es específicamente requerido para la expresión de *Gsh1* y la expresión subsecuente de *GHRH*, regula positivamente la expresión de *SF1*, y suprime tanto la expresión de tirosina hidroxilasa como de Neuropeptido Y. Aunque *Mash1* no es requerido para la expresión de proopiomelanocortina (POMC), es requerido para el desarrollo normal de las neuronas positivas a POMC. Por lo tanto *Mash1* es requerida para la generación de neuronas ventrales neuroendocrinas y juega un papel en la especificación del subtipo de estas neuronas (McNay et al., 2006).

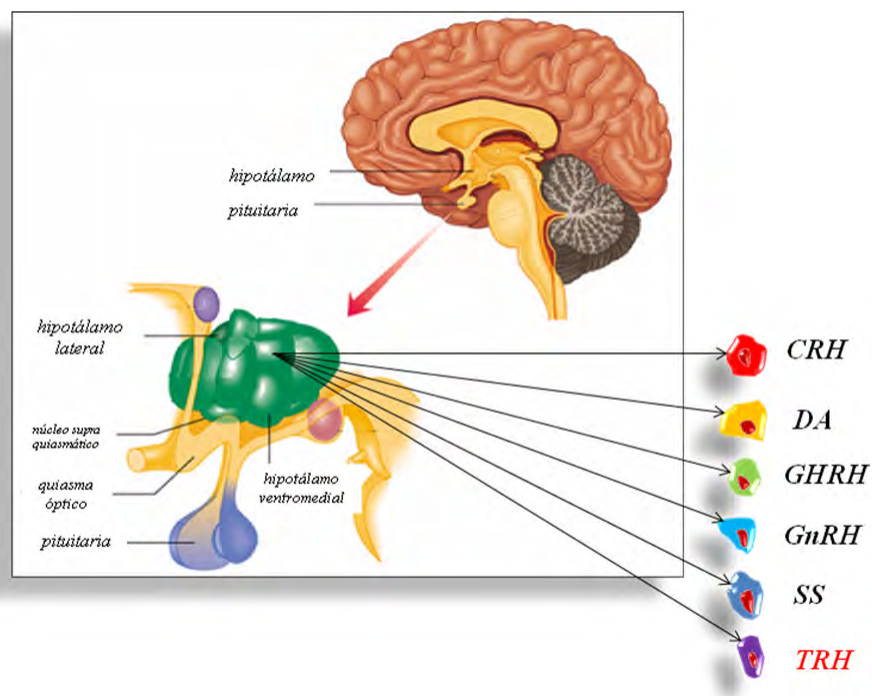


Fig. 2. Hipotálamo. Es una estructura diencefálica con una posición anatómica y funcional estratégica para coordinar diversas funciones homeostáticas del organismo. Se compone de núcleos de células que secretan neurohormonas, responsables de regular la síntesis y liberación de las hormonas pituitarias. Dichas neurohormonas son liberadas a la circulación mediante un sistema portahipofisario que las lleva a ejercer sus funciones sobre la glándula hipófisis o pituitaria. Los factores liberados en esta forma del hipotálamo son la hormona liberadora de corticotropina (CRH), la dopamina (DA), la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH), la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), la somatostatina (SS) y la hormona liberadora de tirotropina (TRH).



TRH

Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT)

La TRH es un neuropéptido que se sintetiza y libera del núcleo paraventricular (PVN) hipotalámico hacia la eminencia media y a través de un sistema portahipofisario llega a la glándula pituitaria, donde regula la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) desde el nacimiento (Shibusawa et al., 2000). Esta hormona liberada a la circulación general a su vez regula la síntesis y secreción en la glándula tiroides de las hormonas tiroideas tetraiodotironina (T4) y triiodotironina (T3). Los niveles séricos de hormonas tiroideas son regulados por la retroalimentación negativa de T3 sobre la biosíntesis de TRH en el hipotálamo y sobre la biosíntesis de TSH en la pituitaria. Los niveles de T3 que están disponibles para regular la biosíntesis de TRH en hipotálamo, son determinados por la desiodación de T4 a T3 dependiente de la desiodasa tipo 2, así como de la inactivación de la T3 dependiente de la desiodasa tipo 3, enzimas que también contribuyen a la maduración del eje (Hernandez et al., 2006; Lechan and Fekete, 2005). El ratón con una mutación nula de *trh* y de la isoforma β del receptor tiroideo (*TRb*) ha demostrado el requerimiento absoluto de TRH para la síntesis tanto de TSH como de hormonas tiroideas, sin embargo se ha mostrado también que TRH no es requerida para el desarrollo de las células tirotrópicas (Nikrodhanond et al., 2006)

Aunque las hormonas tiroideas séricas son detectables durante la etapa fetal y se acumulan en el cerebro e hígado (Obregon et al., 1984; Porterfield and Hendrich, 1992), la retroalimentación negativa de T3 sobre la expresión de TRH en el PVN se establece en la rata hasta después del 7° día postnatal (Taylor et al., 1990b). A este respecto se ha demostrado que ambas isoformas β de los TR contribuyen a la regulación de la TRH hipotalámica (Dupre et al., 2004). Particularmente a TR β 2 se le atribuye un papel crítico en la regulación de las neuronas TRHérgicas del PVN (Abel et al., 2001) (**Fig. 3**).

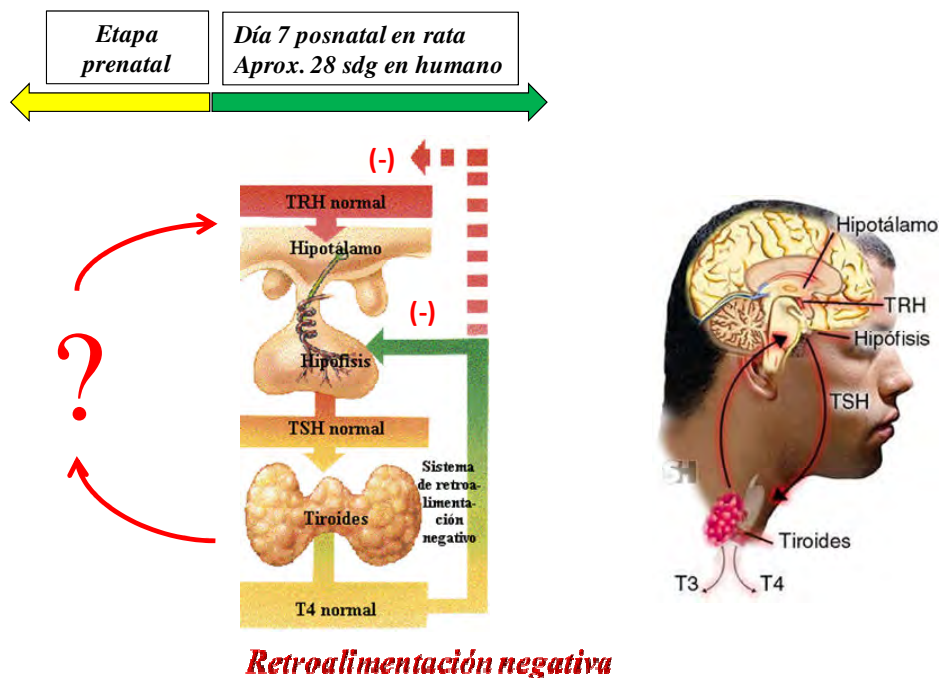


Fig. 3. Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). La TRH secretada por el hipotálamo llega a la hipófisis mediante el sistema portahipofisario, en donde estimula a los tirotropos para sintetizar y liberar a la TSH a la circulación general que alcanza la tiroides y a su vez estimula en esta glándula la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas T4 y T3. Estas hormonas a través de la circulación general llegan tanto al hipotálamo como a la hipófisis en donde inhiben la síntesis de TRH y TSH respectivamente, cerrando un ciclo de retroalimentación negativa que se establece en el desarrollo de la rata al 7° día postnatal y a las 28 semanas de gestación (sdg) en el humano. En la parte izquierda de la figura se indica que no existe información de la modulación de la síntesis de TRH y TSH por T3 antes del establecimiento de la retroalimentación negativa del eje HHT.

Ontogenia

Las células del hipotálamo se originan de las células de la línea media de la placa embrionaria basal, que dan lugar entre otras estructuras a las células neuroepiteliales del 3er ventrículo. A partir de este neuroepitelio es que se originan las células que darán origen a la parte neuroendocrina del hipotálamo. El primordio de la región hipotalámica se logra observar al día embrionario 11 (E11) del desarrollo de la rata. Los núcleos hipotalámicos primitivos pueden observarse sin embargo hasta E15. Mediante técnicas de marcaje retrógrado el PVN, que contendrá a las células del hipotálamo con funciones neuroendocrinas, puede identificarse desde E13 y hasta E15. Las células TRHérgicas comienzan su aparición entre E11 y E15, y en particular las que tienen funciones neuroendocrinas lo hacen entre E12 y E14 (Markakis and Swanson, 1997; Markakis, 2002) (**Fig. 4**).

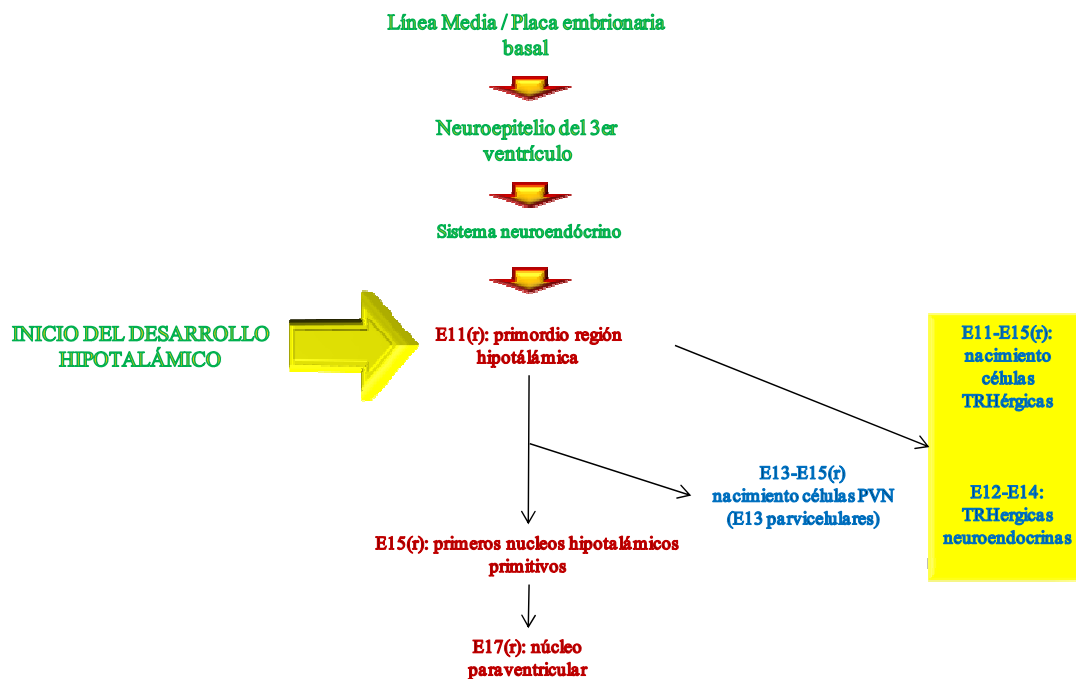


Fig. 4. Ontogenia de células TRHérgicas. Las células de la placa embrionaria basal del tubo neural generan entre otras células a las neuroepiteliales del 3er ventrículo, de donde se producen las células que forman el sistema neuroendócrino. A los 11 días del desarrollo embrionario de la rata (E11(r)) se puede identificar el primordio de la región hipotalámica y en esta región nacen también en E11 y hasta E15 las células TRHérgicas del hipotálamo. Las células TRHérgicas neuroendocrinas, es decir las que liberarán sus productos del hipotálamo a la pituitaria, nacen un día después en E12 y hasta E14. En E13 comienzan a formarse las células de la región parvicelular del PVN. No obstante dicho núcleo puede observarse como una región bien definida solo hasta E17.

Señales que regulan la expresión de TRH

Factores de transcripción.- Uno de los factores de transcripción que se han identificado como importantes en el desarrollo del hipotálamo es el factor de transcripción Sim1, que pertenece a la familia de las proteínas del tipo bHLH-PAS. Sim1 puede ser detectado en los núcleos paraventricular (PVN), supraóptico (SON) y periventricular (pVN) durante el desarrollo. La mutación de este gen produce hipocelularidad en el PVN y SON, y la ausencia de varios neuropéptidos normalmente sintetizados en estos núcleos entre ellos TRH. ARNT2 por otra parte, también es una proteína bHLH-PAS que heterodimeriza con Sim1. También es expresada tanto en el PVN como en el SON y su mutación produce hipocelularidad y carencia de varios fenotipos

incluido el TRHérgico. Sim1 regula en el PVN la expresión de Brn2, un miembro de la familia de proteínas POU-III, entre E12 y E14. La delección de Brn2 produce un fenotipo similar al de la delección de Sim1 que como se mencionó arriba se caracteriza por hipocelularidad del PVN, no obstante afecta a las células positivas para CRH pero no para aquellas positivas a TRH, GHRH o GnRH. Se desconoce si el factor Sim1 tenga algún efecto en el desarrollo de los otros tipos fenotipos neuroendocrinos diferentes al CRHérgico, por otra vía distinta a Brn2 (Markakis, 2002). Los ratones con estas mutaciones mueren poco después de nacer (Michaud et al., 1998)

Por otra parte, el gen Orthopedia (*otp*) es expresado en dominios específicos del diencefalo murino en E10. En E13 se expresa en áreas hipotalámicas y en E17 se transcribe solamente en regiones preópticas y postópticas, que originan algunos de los núcleos hipotalámicos neuroendocrinos entre ellos el PVN que produce TRH además de otros neuropéptidos. En el ratón con una mutación nula para *otp* no se forman los núcleos anterior periventricular, PVN ni SON y por ende no se expresan los neuropéptidos que ahí se producen: CRH, TRH, VP, OT y SS (Pérez-Martínez and Charli, 2006).

Nuestro grupo ha identificado además que KLF4 y KLF10, miembros de la familia de las proteínas Krüppel son importantes en el proceso de diferenciación terminal de las células TRHérgicas puesto que los animales nulos para cualquiera de estos genes muestran una disminución significativa en la expresión de TRH (datos no publicados) (**Fig. 5**).

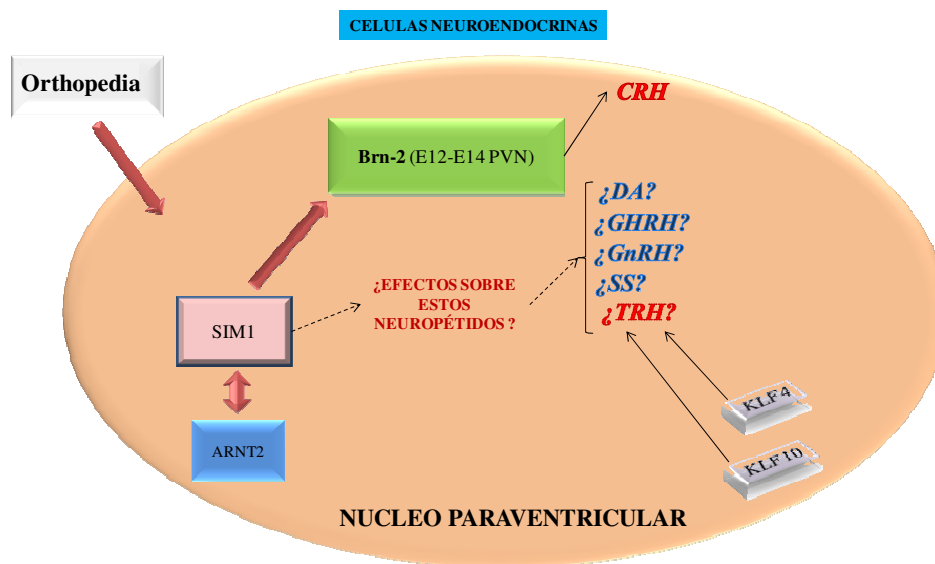


Fig. 5. Factores de transcripción que participan en el desarrollo del fenotipo neuroendocrino. Entre los factores proneurales que contribuyen a la diferenciación de los fenotipos hipotalámicos se cuenta a proteínas homeóticas como Otp o del tipo bHLH como SIM1, ARNT2 o la familia POU-III que contribuyen a la determinación del sitio y formación de los núcleos que contienen a las células neuroendocrinas. La delección de los genes de estas proteínas redundan en una ausencia en la formación de núcleos como el supraóptico o el paraventricular, o en la hipocelularidad de los mismos.



Señales extracelulares.- Las células en proceso de diferenciación en el hipotálamo además de los cambios en la expresión de factores de transcripción a los que están sometidas, están expuestas a diversas señales que intervienen en procesos del desarrollo, crecimiento y mantenimiento del sistema nervioso en general. Entre dichas señales se pueden contar a las neurotrofinas, a los factores de crecimiento, a las hormonas, etc.

Nuestro grupo ha demostrado que el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) incrementa los niveles de RNAm de TRH sin afectar la supervivencia celular en cultivos celulares primarios desde E17. El efecto de BDNF únicamente es observado en una población de neuronas TRHérgicas que expresan el receptor específico para BDNF, el TrkB (Guerra-Crespo et al., 2001). Estudios *in vivo* han indicado también que la expresión del RNAm que codifica para la isoforma catalítica del receptor TrkB precede cronológicamente la expresión de TRH en el PVN de la rata. Ambos RNAm coexisten espacialmente en esta región hipotalámica. Además los cultivos primarios del PVN fetal responden a BDNF incrementando los niveles de RNAm de TRH. Juntos estos resultados sugieren que durante el desarrollo del PVN, la activación de TrkB es un elemento clave para la diferenciación de las neuronas TRHérgicas y consecuentemente, BDNF puede ser un factor decisivo en la adquisición y/o mantenimiento de este fenotipo (Pérez-Martínez and Charli, 2006).

Dado que los miembros de la familia del Factor Transformante del Crecimiento β (TGF β) son secretados por astrocitos hipotalámicos (Bouret et al., 2001; Bouret et al., 2004), nuestro grupo ha investigado también el efecto de esta citocina en un medio que reduce la proliferación glial (Neurobasal/B-27) pero mantiene a las neuronas hipotalámicas. Estos estudios se han enfocado en los eventos tempranos del desarrollo post-mitótico, cuando las neuronas TRHérgicas inician la síntesis de RNAm de TRH *in vivo* o *in vitro* (Burgunder and Taylor, 1989; Perez-Martinez et al., 2001). En estas condiciones y en respuesta a TGF β 2, los cultivos hipotalámicos fetales se desarrollan similarmente a los cultivos suplementados con suero. TGF β 2 incrementa la expresión temprana de RNAm de TRH en cultivos primarios derivados del hipotálamo de rata en E17. Se postula que el efecto de TGF β 2 fuera a través del receptor TGF β RII/I y las proteínas SMAD2/3 en asociación con SMAD4, sin embargo esto aún no se ha demostrado (Pérez-Martínez and Charli, 2006). Estos resultados sugieren que esta citocina controla la expresión del gen de TRH durante la diferenciación terminal. Será interesante determinar si la expresión del gen de TRH mediada por TGF β es un efecto específico o general sobre el desarrollo de los fenotipos neuroendocrinos hipotalámicos.

Como se ha descrito, la síntesis y secreción de TRH en el hipotálamo es regulada de forma negativa en los humanos o animales después de cierto período y a lo largo de toda la etapa adulta, por las hormonas tiroideas, como parte de la función del eje HHT. No obstante, a diferencia de la señalización por factores neurotróficos y factores de crecimiento que ya se ha explorado como se menciona arriba, sobre la diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico hipotalámico, la participación de señalización hormonal aún es un tema poco abordado (**Fig. 6**)

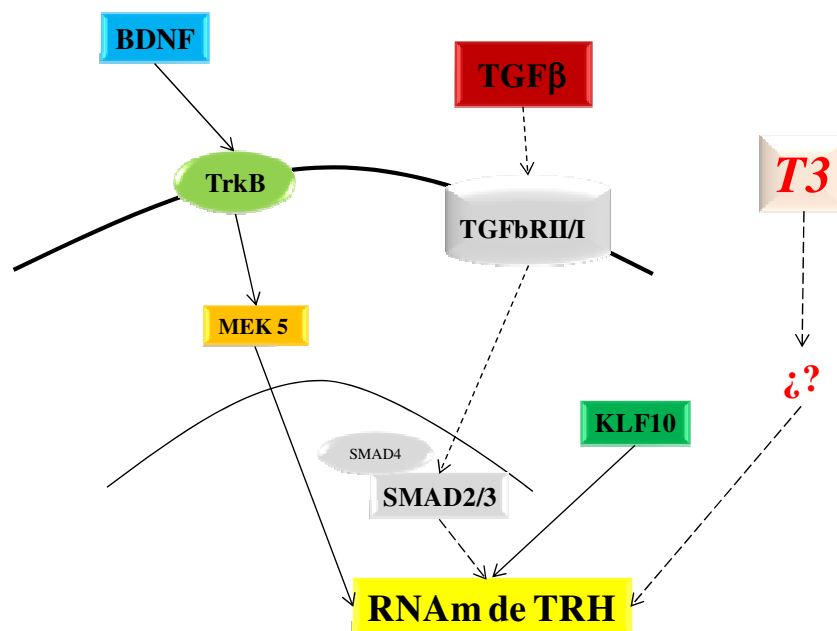


Fig. 6. Señales extracelulares que participan en el desarrollo del fenotipo TRHérgico. Estudios de nuestro grupo demuestran que tanto la neurotrofina BDNF a través de su receptor específico TrkB, como TGFβ regulan los niveles de RNAm de TRH en cultivos primarios hipotalámicos de ratas en E17, sugiriendo que dichas señales pudieran formar parte de un programa de diferenciación terminal sobre el fenotipo TRHérgico. El interés de este trabajo se centra en estudiar un posible papel de T3 también sobre la diferenciación terminal de dicho fenotipo. En gris se representan las moléculas que se postulan como parte de la vía que TGFβ utilizaría para sus efecto estimulador sobre el RNAm de TRH. Las líneas punteadas indican interacciones hipotéticas o definidas de forma incompleta, entre las moléculas que se señalan.

HORMONAS TIROIDEAS Y SISTEMA NERVIOSO

La glándula tiroides captura el yodo que se encuentra en la circulación proveniente de la dieta a través de bombas de yodo localizadas en el borde periférico de las células foliculares. El yodo es oxidado por una peroxidasa y se acopla a los residuos de tirosina dando lugar a la formación de monoyodotirosina y diyodotirosina que sirven de base para sintetizar tiroglobulina, la cual es almacenada en el coloide tiroideo. En respuesta al estímulo de la hormona estimulante de la tiroides



(TSH), se activa la proteólisis que libera a las hormonas activas tetrayodotiroina (T4) y triyodotirona (T3) (Galton et al., 2007). Al llegar al cerebro son transportadas por moléculas especializadas como el transportador de monocarboxilato-8 (MCT-8) que está altamente expresado en las poblaciones neuronales sensibles a la hormona tiroidea. Estos transportadores son importantes para el desarrollo y función de cerebro y sus defectos originan patologías como el síndrome de Allan-Herndon-Dudley que es un retardo psicomotor ligado al cromosoma X asociado a hipotonía congénita que progresa a la espasticidad ;(Gruters, 2007; Heuer et al., 2005; Heuer, 2007; Schwartz and Stevenson, 2007). La tiroxina entonces es convertida en el sistema nervioso a la forma transcripcionalmente activa 3,5,3'-triyodotironina (T3), por las desiodasas tipo 1 y 2 (D1, D2) (Courtin et al., 2005; Kohrle, 2007; Yen, 2001).

La importancia de las hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso se ha dilucidado en gran medida a partir de los efectos que su deficiencia produce ya sea en condiciones naturales como la hipotiroxinemia o el hipotiroidismo congénito, así como mediante el uso de inhibidores de la acción tiroidea como el propiltiouracilo o el metimazol. La deficiencia durante los períodos fetal y postnatal temprano produce graves anormalidades en la neurogénesis, el crecimiento axonal y dendrítico, la sinaptogénesis, la migración neuronal, la mielinización así como la muerte neuronal entre otros fenómenos (Chan and Kilby, 2000), y ha puesto en evidencia todos los eventos del desarrollo del sistema nervioso en los que estas hormonas participan. Algunos de los efectos que se producen por la deficiencia de hormonas tiroideas que pueden ser revertidos por una suplementación adecuada, incluyen la disminución en la expresión de diversos genes, el retardo en el crecimiento del encéfalo por una neurogénesis inapropiada; el incremento en el estrés oxidativo que contribuye a la apoptosis, e inclusive cambios en la conducta (Dasgupta et al., 2005; Kobayashi et al., 2005; Uchida et al., 2005) (**Fig. 7**).

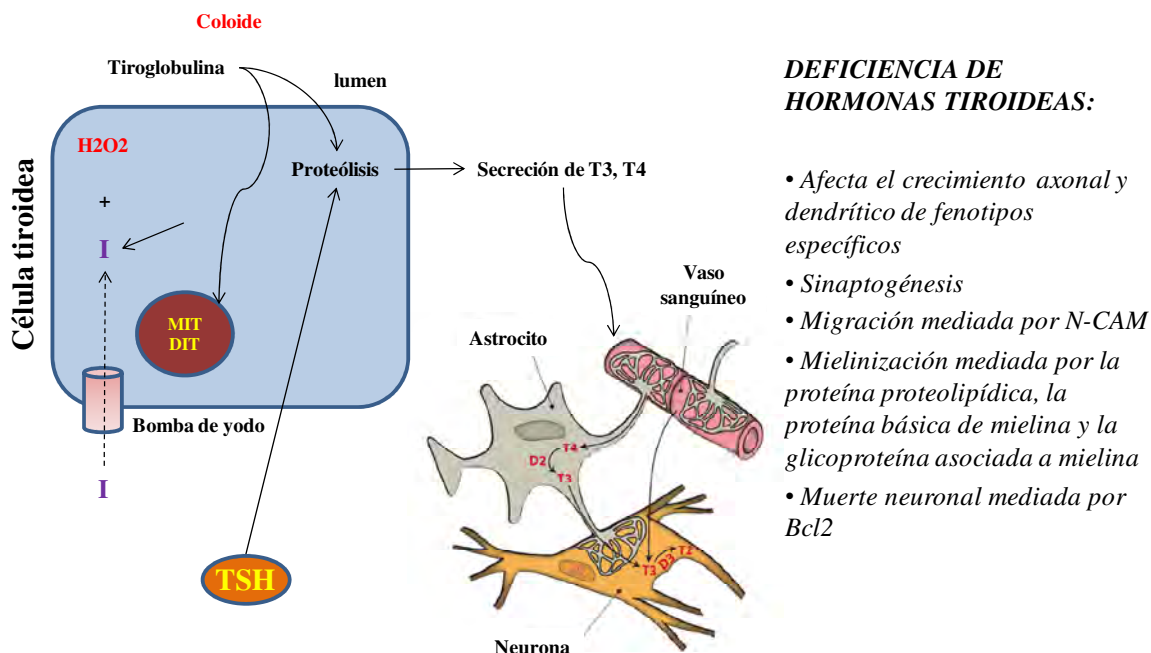


Fig. 7. Metabolismo y funciones de las hormonas tiroideas en el sistema nervioso. Para la síntesis de hormonas tiroideas el yodo (I) es capturado por las células de la glándula tiroidea para ser incorporado a grandes moléculas de tiroglobulina en el coloide tiroideo. En respuesta al estímulo de la TSH, la tiroglobulina sufre proteólisis para generar moléculas de tetraiodotironina (tiroxina o T4) o triiodotironina (T3) las cuales son secretadas a la circulación general en donde son transportadas por globulinas específicas o por albúmina. Los residuos de monoyodotirosina (MIT) o diyodotirosina (DIT) quedan disponibles para una nueva iodación y almacenamiento en el coloide como tiroglobulina. Al llegar al sistema nervioso T3 y T4 acceden a las neuronas mediante transportadores específicos como el transportador de monocarboxilato-8 (MCT8) ya sea directamente o por intermedio de los astrocitos. Dentro de las células, la T4 es desiodada por la Desiodasa 2 (D2) para generar una mayor concentración de T3, que es la forma metabólicamente más activa. T3 es inactivada para su desecho mediante la desiodación a diyodotironina (T2) por la Desiodasa 3 (D3). La importancia de las hormonas tiroideas en el desarrollo del sistema nervioso se ha puesto de manifiesto sobre todo en los casos de deficiencia en los cuales existen alteraciones en diversos niveles por ejemplo, sobre el crecimiento axonal o dendrítico, la sinaptogénesis, migración, mielinización o inclusive la muerte neuronal.

No obstante sus diversos efectos generales, las hormonas tiroideas ejercen también una gama muy amplia de efectos específicos sobre cada una de las regiones del sistema nervioso e inclusive sobre estructuras, células y moléculas en particular.

Corteza Cerebral.- En la corteza cerebral de ratas deficientes en hormonas tiroideas, se incrementa el número de cuerpos neuronales mientras que su tamaño promedio se reduce. Hay también una disminución en la densidad de los axones terminales, especialmente en la lámina IV, y una reducción en el crecimiento y ramificación de las dendritas de las neuronas piramidales (Legrand, 1979). Algunos de los genes implicados en estos efectos son los de *reelina* y *dab1* pues se ha demostrado que son necesarios para la migración y laminación neuronal apropiada durante el desarrollo del cerebro y que están bajo el control de la hormona tiroidea. En ratas hipotiroideas disminuyen los niveles de RNAm y proteína de *reelina* durante el período perinatal (E18) y el día postnatal 0 (P0). Este efecto de disminución de los niveles de *reelina* es evidente en las células de



Cajal-Retzius de la lámina I, así como en las láminas V/VI de la corteza, en el hipocampo, y en las neuronas granulares del cerebelo (Alvarez-Dolado et al., 1999). La hipotiroxinemia transitoria en el inicio de la corticogénesis altera la migración tangencial de neuronas derivadas de la eminencia media ganglionar (Cuevas et al., 2005). Además, las hormonas tiroideas afectan la expresión de neurotrofinas que como se sabe participan en fenómenos tales como la diferenciación neuronal, crecimiento de neuritas, sinaptogénesis e inclusive apoptosis. Se ha reportado que niveles incrementados de pro-factor de crecimiento neural (NGF) y del receptor a neurotrofina p75 en la corteza cerebral de rata hipotiroidea están asociados con apoptosis aumentada (Kumar et al., 2006). También en la corteza cerebral de neonatos hipotiroideos de rata se afectan los niveles de transcrito de otras proteínas importantes para el metabolismo celular, como los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3 (Santalucia et al., 2006). Los efectos de la insuficiencia tiroidea en esta región además de los efectos moleculares o celulares mostrados sobre la formación de la corteza puede también producir otra displasia en el desarrollo como es la malformación celular en el cuerpo calloso (Goodman and Gilbert, 2007).

Cerebelo.- Probablemente el cerebelo es la región del sistema nervioso mas ampliamente estudiada en relación al papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo. Existen varios genes regulados transcripcionalmente por hormonas tiroideas en el cerebelo. Entre tales genes quizás el mejor estudiado es la proteína básica de mielina (MBP), pero también se ha descrito una disminución en los cerebros hipotiroideos, de otras importantes proteínas de la mielina como la proteína proteolípídica, y la glicoproteína asociada a mielina expresada en los oligodendrocitos (Munoz et al., 1991). Otro gen regulado por hormona tiroidea que puede ser crucial para el desarrollo del cerebelo es el que codifica para la Molécula de Adhesión de Células Neurales (N-CAM), que controla las interacciones célula-célula que afectan la migración neuronal, la diferenciación y la sinaptogénesis, todos procesos que se alteran en el hipotiroidismo perinatal. Por ejemplo, se ha observado que durante el hipotiroidismo neonatal en la rata, inducido por metimazol, se incrementa ligeramente en el cerebro la expresión de RNAm de N-CAM, y en una mayor proporción del gen neuronal RC3. De hecho este último fue el primer gen del cual se identificaron niveles alterados de transcrito en respuesta a privación tiroidea (Munoz et al., 1991).

Se ha descrito un efecto regulador directo de las hormonas tiroideas sobre las neurotrofinas BDNF y neurotrofina 3 (NT3). Algunos de los cambios anatómicos observados en la rata hipotiroidea, como la disminución en la arborización dendrítica y sinaptogénesis de las células de Purkinje o las células granulares se asocian a una disminución en los niveles de RNAm de BDNF y



NT3. Estos efectos se observan también en el ratón con una mutación nula para *bdnf*. Tales deficiencias se revierten cuando se administra BDNF o NT3 (Koibuchi and Chin, 2000). Además se ha demostrado una asociación entre los efectos de hormonas tiroideas y Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en vista de que la proliferación de precursores de neuronas cerebelosas inducida por astrocitos tratados con hormona tiroidea es mediada por la cooperación entre el contacto celular y factores solubles e involucra la vía de EGF y proteína cinasa A (PKA) (Martinez and Gomes, 2005).

En el cerebelo murino existen además varias alteraciones anatómicas inducidas por el hipotiroidismo perinatal que incluyen: reducción del crecimiento y la ramificación de la arborización dendrítica de las células de Purkinje, retardo en la proliferación y migración de las células granulares, retardo en la mielinización, y cambios en la conexión sináptica entre las neuronas cerebelares y las fibras neuronales aferentes. El cambio en la migración de las células granulares se asocia a un incremento en el RNAm de TAU cuyo splicing está bajo el control de las hormonas tiroideas (Aniello et al., 1991). La expresión de TAU es un indicador en esta y otras regiones de un proceso de diferenciación terminal.

Estos cambios solo puede evitarse si se suplementa hormona tiroidea dentro de las dos semanas posteriores al nacimiento (Farwell et al., 2005; Koibuchi and Chin, 2000; Koibuchi and Iwasaki, 2006; Manzano et al., 2007). Algunos de los efectos arriba mencionados se han observado como una consecuencia de los efectos tóxicos de metabolitos hidroxilados de policloruros de bifenilo (PCB) o monometil mercurio (MeHg) y son atribuibles a una inhibición de la transcripción dependiente de receptor tiroideo, al disociar dicho receptor de su elemento de respuesta específico (TRE) en la región promotora de un gen regulado por hormonas tiroideas (Koibuchi and Iwasaki, 2006). Los efectos tóxicos incluyen entre otros la inhibición de la extensión de las dendritas de las células de Purkinje del cerebelo, dependiente de hormona tiroidea (Kimura-Kuroda et al., 2005; Roegge et al., 2006).

Las hormonas tiroideas promueven en una forma dependiente de la dosis, la supervivencia postmitótica al evitar la apoptosis de nuevas células granulares tempranamente formadas y diferenciadas. Esta regulación puede ser a través de la proteína Bcl-2 que es conocida por prevenir la muerte neuronal. (Muller et al., 1995; Singh et al., 2003) (**Fig. 8**).

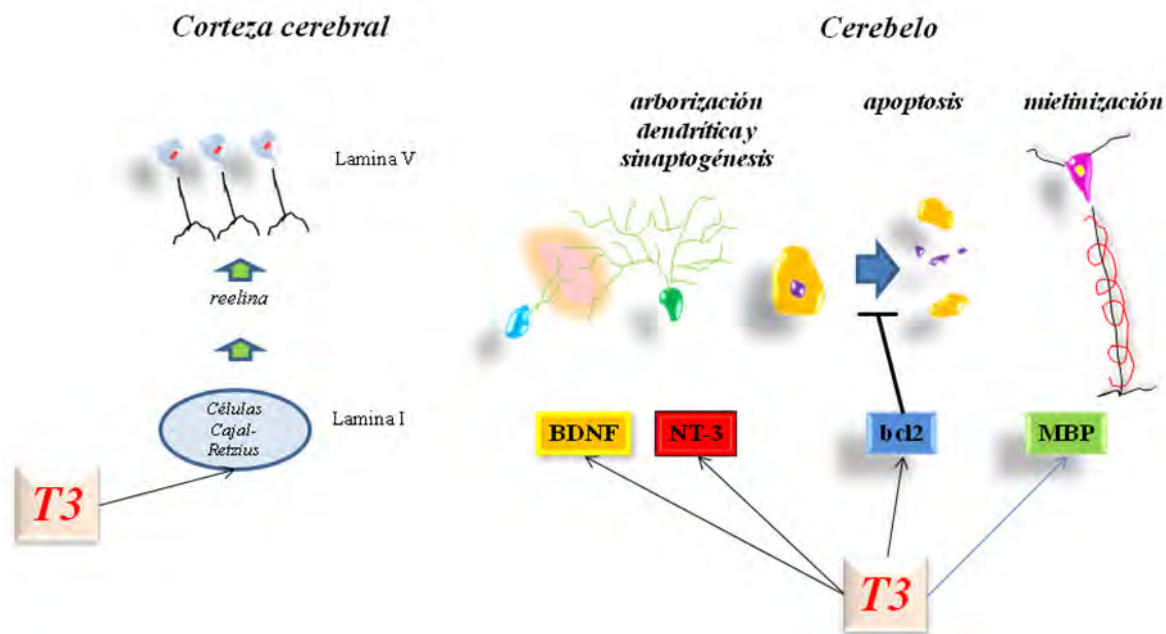


Fig. 8. Ejemplos de regulación del desarrollo por hormonas tiroideas sobre algunas regiones del sistema nervioso. En la corteza cerebral las hormonas tiroideas regulan en las células Cajal-Retzius localizadas en la lámina I, la expresión de reelina que es una proteína requerida para la correcta migración y laminación por lo cual la deficiencia tiroidea produce en este caso una disminución en el tamaño neuronal, en la densidad axonal y en la ramificación dendrítica de las células que migran a la lámina V en respuesta a reelina. En el cerebelo las hormonas tiroideas contribuyen a diferentes procesos del desarrollo como la expresión de neurotrofinas involucradas en la arborización dendrítica y la sinaptogénesis, particularmente el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3); y a la expresión de bcl2 que contribuye con sus propiedades antiapoptóticas a evitar la muerte de los oligodendrocitos. Este efecto y su participación sobre la expresión de proteínas de la mielina como la proteína básica de mielina (MBP) explicarían los efectos generales que las hormonas tiroideas cumplen en la mielinización durante el desarrollo del cerebelo.

Hipocampo.- En el hipocampo de rata se ha descrito una disminución de la expresión de c-fos y c-jun, así como defectos en la Potenciación a Largo Plazo (LTP) ante la deficiencia congénita de yodo e hipotiroidismo (Dong et al., 2005), y se ha postulado que dichas deficiencias durante el desarrollo contribuyen al menos en la rata adulta a disfunción sináptica en el giro dentado así como a una reducción en el aprendizaje espacial (Gilbert and Sui, 2006).

Retina.- Durante el desarrollo de la retina de ratón las proteínas S-opsina o M-opsina que sensan las longitudes de onda corta y media respectivamente en los conos fotorreceptores para la visión en color, son reguladas de forma selectiva en función de un gradiente de hormonas tiroideas (Roberts et al., 2006). En este caso aparentemente la suplementación postnatal rescataría las anormalidades del desarrollo inducidas por hipotiroidismo congénito-neonatal en la retina de la rata (Pinazo-Duran et al., 2005).

Oído.- Se ha reportado la maduración de sinapsis en respuesta a la acción de hormonas tiroideas en células pilosas del oído interno de ratón (Sendin et al., 2007).

Hipotálamo.- Estudios en cultivos libres de suero de células hipotalámicas fetales han permitido identificar que T3 incrementa el tamaño celular, así como la longitud de las neuritas y la arborización de neuronas dopaminérgicas aunque no el número de las mismas (Puymirat et al., 1983). En estas mismas condiciones de cultivo, T3 promueve la liberación de TRH por neuronas hipotalámicas en desarrollo en cultivo (Loudes et al., 1983). Sin embargo, el papel de T3 sobre la expresión de RNAm de TRH en el desarrollo del fenotipo TRHérgico es esencialmente desconocido (Fig. 9).

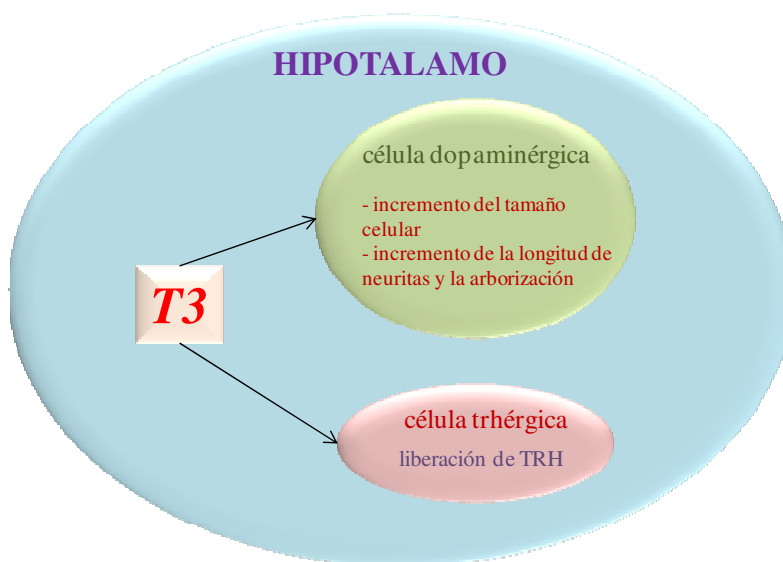


Fig. 9. Efectos de las hormonas tiroideas en el desarrollo hipotalámico. Hasta el momento las funciones descritas de T3 sobre el desarrollo de hipotálamo incluyen: a) sus efectos sobre un incremento del tamaño celular, la longitud de las neuritas y la arborización de células positivas a dopamina y b) en células TRHérgicas sobre la liberación de TRH.

RECEPTORES TIROIDEOS

La T3 regula la expresión de sus genes blanco, positiva o negativamente, a través de los receptores tiroideos (TRs) nucleares.

Estructura.- Se han identificado dos locus para TRs (α y β); que codifican nueve productos proteicos, los cuales se originan por splicing alternativo y uso diferencial de promotores. El gen de TR α codifica cinco productos proteicos (TR α 1, TR α 2, TR α 3, y los productos truncados Δ TR α 1 y Δ TR α 2) de los cuales solamente TR α 1 une T3, pero la isoforma truncada no une DNA. El gen TR β



codifica cuatro proteínas de unión a T₃, de las cuales TR β 1, TR β 2 y TR β 3 también se unen a elementos de respuesta en el DNA. Además, la proteína truncada Δ TR β 3 une T₃ pero no DNA. No hay un papel fisiológico claro para las proteínas no receptoras ;(Santisteban and Bernal, 2005; Zhang and Lazar, 2000).

Expresión.- Durante el desarrollo murino, el RNAm de TR α 1 ha sido detectado desde el día E11.5 en el tubo neural y mas tarde en todas las areas del cerebro, mientras que las variantes de los RNAm de TR β están restringidos al diencéfalo y al mesencéfalo desde E12.5 (Bradley et al., 1992). De manera similar, en cultivo de oligodendrocitos de ratón se ha mostrado la colocalización de las isoformas TR α y TR β 1 durante una etapa temprana del desarrollo. En este modelo la isoforma TR β 1 varía su expresión a lo largo de la maduración en tanto las isoformas α disminuyen tal expresión durante la maduración terminal (Bury et al., 2002). En corteza cerebral humana del primer y segundo trimestre de gestación se han identificado y cuantificado los RNAm de TR α 1, TR β 1 y TR β 2, siendo TR α 1 el más abundante en esta etapa en comparación a las otras isoformas y en comparación a su propia expresión en etapa adulta. El RNAm de TR β 1 fue identificado solo en el 26% de las muestras (Chan et al., 2002).

Regulación de la expresión por hormonas tiroideas.- Existen diversas evidencias que progresivamente refuerzan el papel de las hormonas tiroideas sobre la expresión de sus propios receptores. Por ejemplo, en fetos humanos de tercer trimestre la disminución en los niveles de hormonas tiroideas como ocurre en la restricción de crecimiento intrauterino, se correlaciona con una disminución en los niveles de RNAm y expresión de proteínas de los receptores α 1, α 2, β 1 y β 2 tanto en la corteza cerebral como en las células de Purkinje del cerebelo cuando se compara con cerebros sanos (Kilby et al., 2000). También se ha postulado un papel de T₃ sobre la estabilidad de las diferentes isoformas de TRs, aunque ésto ha sido en células HTB-185 derivadas de meduloblastoma humano e incluye una disminución en los niveles de RNAm aparentemente mediada por síntesis de nuevas proteínas (Monden et al., 2006). A manera de comparación con otra especie distinta a los mamíferos, en el pez "lenguado de invierno" se ha observado una regulación transcripcional dependiente de hormona tiroidea de TR α , pero no de TR β , seguida por un incremento en los conos verdes en la retina premetamórfica (Mader and Cameron, 2006), lo cual habla de la conservación de las características de regulación sobre los receptores tiroideos del sistema nervioso en el desarrollo en diversas especies.



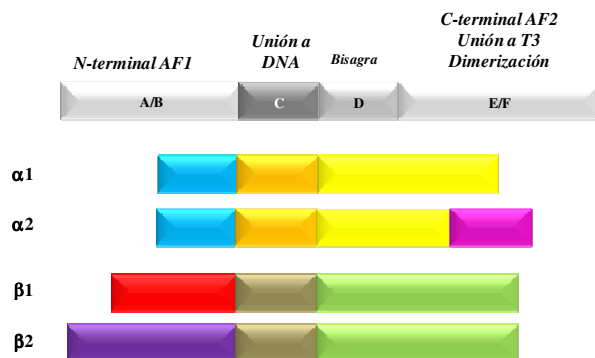
Moduladores.- Las propiedades reguladoras bimodales de los TRs son reguladas a su vez, por interacciones proteína-proteína en forma de homo- o heterodímeros en asociación con receptores retinoides, estrogénicos u otros receptores nucleares, o con la maquinaria de transcripción basal. Los receptores de hormona tiroidea, tanto en su forma no ligada (aporreceptor) como en su forma ligada, se une a secuencias hexaméricas conocidas como elementos de respuesta a T3 localizados en los elementos reguladores de los genes blanco (Moore and Brent, 1991; Oppenheimer et al., 1983; Umesono et al., 1991).

El aporreceptor usualmente reprime la transcripción al asociarse a correpresores como SMRT, NcoR, Alien, los cuales reclutan desacetilasas de histonas, que desacetilan la cromatina manteniéndola por tanto en su estado compacto. Después de la unión de la hormona, los correpresores son liberados y los coactivadores como SRC-1 así como acetilasas de histonas son reclutados para permitir relajar la cromatina y permitir la transcripción (Glass and Rosenfeld, 2000; Ishii et al., 2004; Koibuchi and Iwasaki, 2006; Santisteban and Bernal, 2005). SRC-1 es el más abundante coactivador en el cerebro. Se expresa en varias regiones tan temprano como al día E11 en el ratón. La mutación nula en el ratón del gen *src1* induce un desarrollo anormal del cerebro, similar al que se ve en el animal hipotiroideo perinatal (Koibuchi and Iwasaki, 2006). Las hormonas tiroideas regulan la expresión de sus propios comoduladores al menos en el cerebelo de ratón. Uno de esos comoduladores cuya expresión es incrementada es el correpresor Hairless, y la isoforma involucrada en dicha regulación es TR α . Las hormonas tiroideas también incrementan la expresión del correpresor SMRT y disminuyen la del coactivador SRC-1 (Ramos and Weiss, 2006).

Funciones.- Se han reportado diversos estudios en donde las hormonas tiroideas ejercen efectos selectivos sobre múltiples funciones en virtud de la isoforma a la cual se unan en cada región del sistema nervioso. Por citar algunos ejemplos, se ha descrito que TR α 1 es responsable del desarrollo dendrítico de las células de Purkinje que depende de la acción de hormona tiroidea (Heuer and Mason, 2003). Por otra parte, entre TR α 1 y las isoformas β se observa una regulación diferencial de la expresión génica de *Kcnq4* y presta durante la diferenciación final de las células pilosas externas del oído (Winter et al., 2006). En tanto que la acción de un agente como el bisfenol-A, antagoniza la acción de TR β pero no TR α , y produce una regulación positiva de RC3/neurogranina en el giro dentado del cerebro de rata durante el desarrollo (Zoeller et al., 2005). En algunos procesos del desarrollo en contraste a lo anterior, se han descrito acciones solamente atribuibles a TR β 2, las cuales como en el caso de la retina de ratón pueden ser diferenciales activando el promotor de *opsina* en los conos M y suprimiendo dicha función en los conos S (Yanagi et al.,

2002). En el cerebro adulto de mamíferos se ha descrito inclusive que la neurogénesis, al menos en la zona subventricular ocurre por la acción de hormona tiroidea a través de TR α (Lemkine et al., 2005) (**Fig. 10**).

A)



B)

E11.5	α tubo neural	
E12.5 – E19.5	$\alpha 1$ y $\alpha 2$ todo el neuroeje	$\beta 1$ telencéfalo
E13.5		$\beta 2$ neuroepitelio hipotalámico y pituitaria anterior
E15.5		$\beta 2$ NPV y VM
E19.5		RNAm de $\beta 2$ en subículo, n. caudado rostral del putamen, CA1

C)

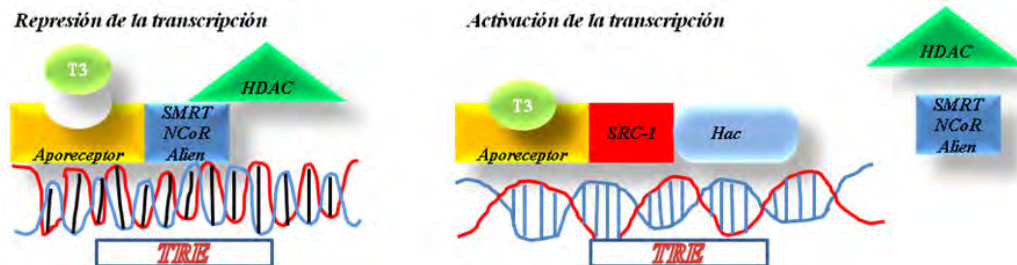


Fig. 10. Estructura y funciones de los receptores tiroideos. A) Los receptores tiroideos pertenecen a la gran familia de receptores tiroideos y esteroideos los cuales se caracterizan por una estructura básica que comprende un dominio de transactivación, uno de unión a DNA y uno de unión a hormona tiroidea o para homo- o heterodimerización. B) Las isoformas α aparecen en el desarrollo en etapas tempranas y en una distribución amplia a lo largo del neuroeje y coinciden con el nacimiento de las neuronas TRHérgicas neuroendocrinas. La expresión de las isoformas β es mas tardía y su distribución mas restringida. C) Los receptores tiroideos actúan como factores de transcripción y su acción estimuladora o inhibidora sobre la expresión génica está modulada por su unión a la T3, a cofactores activadores o represores y a moléculas remodeladoras de la cromatina.



Mutaciones.- Una mutación en la región carboxilo terminal del receptor TR α 1 produce una proteína con incapacidad para unir hormona tiroidea y con otras alteraciones de transactivación, así como con una fuerte actividad dominante negativa. Esta mutación da como consecuencia una disminución en la utilización de glucosa en todas las regiones del cerebro de ratones heterocigos, así como una reducción en la expresión cerebelosa del gen 1 relacionado a sinaptotagmina (*srg1*) un gen regulado positivamente por hormona tiroidea en la formación y función de las sinapsis (Itoh et al., 2001). Este tipo de mutación produce en la vida adulta del ratón ansiedad, daño en la memoria y disfunción locomotora aunque se ha descrito que estas alteraciones pueden ser corregidas administrando dosis altas de T3 (Venero et al., 2005).

En contraste, la deficiencia en la unión de T3 por mutación del locus β de TR deja un receptor mutante en su forma no ligada que entonces interacciona con moléculas correpressoras que simulan un estado hipotiroideo independientemente de las concentraciones circulantes de hormona tiroidea (Hashimoto et al., 2001), las cuales junto con la concentración de TSH es elevada mostrando una patología de resistencia a hormona tiroidea caracterizada en el ratón transgénico por hiperactividad, impulsividad y falta de atención que en el humano se ha relacionado con el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (ADHD) (Siesser et al., 2005).

Mutaciones nulas en ratones.- La delección de TR α 1 evita las alteraciones estructurales del cerebelo inducidas por el hipotiroidismo tales como la migración de células granulares postmitóticas o la diferenciación terminal de las células de Purkinje, sugiriendo que es la acción represora del aporreceptor y no la deficiencia de hormona tiroidea, lo que produce los efectos observados durante el hipotiroidismo (Morte et al., 2002). En contraste, dicha deficiencia de TR α 1 en cerebelo, produce una fuerte disminución en la inmunoreactividad a nestina y a Proteína Acídica Fibrilar Glial (GFAP) en astrocitos maduros, células epiteliales de Golgi y procesos de Bergmann y aquí el hipotiroidismo normaliza la apariencia de estos marcadores en el ratón mutante postnatal, sugiriendo en este caso que la isoforma β ligada a T3, tiene efectos deletéreos sobre la diferenciación de los astrocitos en ausencia de TR α 1 (Morte et al., 2004). La carencia de TR α 1 se asocia además con alteraciones selectivas de la conducta y de los circuitos hipocampales en particular un menor número de terminales GABAérgicas sobre las neuronas de la región CA1 (Guadano-Ferraz et al., 2003). Como se mencionó arriba la isoforma TR β 2 es esencial en los roedores para el desarrollo de los fotorreceptores verdes en los conos y su delección produce una



pérdida selectiva de los conos M y un incremento en la inmunorreactividad de la opsina S en los conos (Ng et al., 2001).

La mutación nula de ambas isoformas α producen un hipotiroidismo progresivo que conduce a la muerte a los ratones a las 5 semanas del nacimiento (Macchia et al., 2001; Zhang and Lazar, 2000). En contraste, la mutación nula de las isoformas β produce diversas anomalías del metabolismo tiroideo, con una resistencia a la retroalimentación negativa a nivel del TRH en el hipotálamo, pero el defecto es compatible con la vida de los ratones (Abel et al., 2003; Kaneshige et al., 2000). Sorprendentemente la mutación nula simultánea de las isoformas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$ es compatible con la vida aunque cursa con diversas alteraciones como incremento del RNAm de TRH en varios núcleos incluyendo neuronas parvocelulares del PVN y núcleos del rafe (Calza et al., 2000; Gothe et al., 1999). La mutación nula de los tres TR ($\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$) resulta en la persistencia de células precursoras de oligodendrocitos, mielinización alterada en el nervio óptico y algunas veces degeneración de las neuronas de los ganglios de la retina (Baas, 2002) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Efectos de la mutación nula de los genes de receptores tiroideos sobre el eje tiroideo

TRα	TRβ (síndrome de Refetoff- resistencia a hormonas tiroideas)	$\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$
La mutación nula de ambas isoformas produce: - Hipotiroidismo progresivo - Detención del crecimiento que produce la muerte cinco semanas después del nacimiento	- Incremento en los niveles séricos de T4 y T3 - Incremento en los niveles del RNAm de TSHb en la pituitaria - Incremento en la secreción de TSH - Aumento en el tamaño de la tiroides	- Incremento en los niveles del RNAm de TRH en varios núcleos incluyendo neuronas parvocelulares del NPV y núcleos del rafe

Los diversos modelos de deficiencia de una o varias isoformas de receptores tiroideos arrojan información poco concluyente respecto al papel de los mismos en el desarrollo del fenotipo TRHérgico neuroendocrino. Las mutaciones nulas de ambas isoformas α muestran hipotiroidismo progresivo y muerte postnatal temprana mientras que la delección exclusiva de la isoforma $\alpha 1$ manifiesta sobre todo alteraciones en la formación del cerebelo, pero no en la estructura del hipotálamo. Estos datos sugieren una participación tardía de estas isoformas en el desarrollo hipotalámico. En tanto la deficiencia de isoformas β se relaciona sobre todo con resistencia a hormonas tiroideas, lo cual tiene que ver mas con la maduración en la respuesta del eje tiroideo a la retroalimentación negativa por hormonas tiroideas que con el desarrollo del fenotipo TRHérgico.



JUSTIFICACION

Los bajos niveles de hormonas tiroideas durante la gestación humana producen deficiencias en varios índices neurológicos después del nacimiento como son aquellos que se refieren a la atención, o a las habilidades motoras sobretodo en infantes pretérmino y predicen un pobre desarrollo cognitivo y motor a lo largo de la infancia (Ishaik et al., 2000). La hipotiroxinemia transitoria de los niños nacidos prematuramente está asociada por ejemplo con defectos neurológicos y craneales graves (Huang et al., 2002). Por estas mismas causas, se ha observado un incremento en el trastorno por déficit de atención e hiperactividad en la descendencia de madres expuestas a deficiencia moderada de yodo, particularmente en países en desarrollo (Vermiglio et al., 2004). En algunos casos las deficiencias en las hormonas tiroideas se asocian con los efectos tóxicos de compuestos como los hidrocarburos aromáticos polihalogenados que afectan seriamente la función cognitiva desde las etapas mas tempranas del desarrollo (Builee and Hatherill, 2004).

De acuerdo a algunos autores, el tratamiento con T3 inmediatamente después del nacimiento es suficiente para evitar gran parte del daño cerebral inducido por el hipotiroidismo neonatal o inclusive congénito, mejorando el desarrollo cognitivo, en tanto que una suplementación deficiente puede permitir la persistencia de problemas conductuales (Bongers-Schokking et al., 2000). Algunos resultados sugieren que si los pacientes con hipotiroidismo congénito son tratados temprano (<13 días de nacidos) con dosis altas de levotiroxina, se puede esperar un desarrollo psicomotor normal, independientemente del tipo de hipotiroidismo congénito (Bongers-Schokking, 2001). No obstante, hay reportes que consideran que los efectos de dichos tratamientos deberían tomarse con reserva en vista de que varios de los estudios al respecto, se han llevado a cabo con un pequeño número de pacientes y que se requieren pruebas de tamaño suficiente para detectar diferencias clínicamente importantes en resultados de neurodesarrollo (Osborn, 2000).

Pero al margen de lo anterior, la T3 actúa en algunos casos dentro de una ventana de tiempo crítica en el desarrollo del sistema nervioso, como se ha observado en el desarrollo del cerebelo (Koibuchi et al., 2003) o de la cóclea (Karolyi et al., 2007), o en el establecimiento del punto de control del funcionamiento de eje tiroideo (Alonso et al., 2007) y en tales casos el tratamiento postnatal, sin embargo, no puede rescatar completamente el desarrollo anormal del cerebro inducido por el hipotiroidismo *in utero* (por ejemplo por deficiencia de yodo materno) (Koibuchi and Iwasaki, 2006). Si la acción de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo de las células TRHérgicas neuroendocrinas del hipotálamo sigue también el patrón de acción durante una ventana crítica de tiempo es algo que aún requiere determinarse, y es de suma importancia hacerlo, puesto que toda la



regulación de los niveles adecuados de hormonas tiroideas y con ello sus acciones no solo sobre el desarrollo y función del sistema nervioso postnatal, sino sobre toda la economía a lo largo de la vida de un organismo, dependerían del desarrollo adecuado de un limitado lapso del período prenatal.

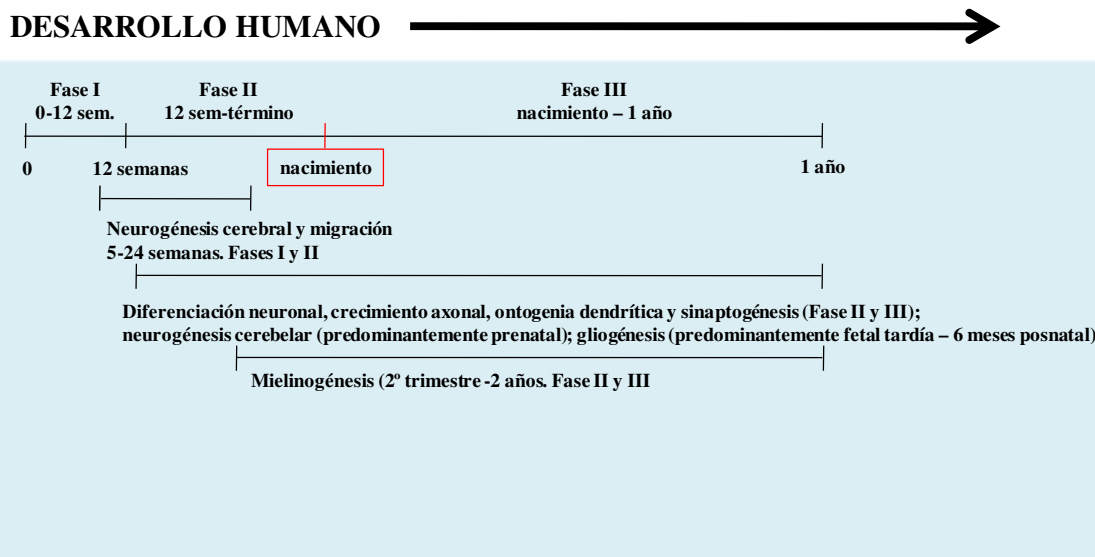


Fig. 11. Ventanas críticas en el desarrollo del sistema nervioso para la acción de las hormonas tiroideas. Durante la deficiencia intrauterina de hormonas tiroideas por falta de suplementación de yodo, hipotiroidismo o hipotiroxinemia o hipotiroidismo materno o congénito, diversos procesos del desarrollo se ven alterados. Algunos de estos procesos que tienen que ver con la diferenciación neuronal o glial, la mielinización y en general el desarrollo anatomo-funcional del sistema nervioso pueden completarse si al neonato se le suministran las concentraciones adecuadas de hormonas tiroideas. No obstante, algunos procesos particularmente relacionados a la neurogénesis y a la migración neuronal, concluyen antes del nacimiento y no responden o lo hacen en una forma inadecuada, tras una reposición postnatal, dando como resultado la persistencia de defectos morfológicos y/o fisiológicos que repercuten en disfunciones motoras, psicológicas y endocrinas a lo largo de la vida.



HIPÓTESIS

Con base en lo expuesto anteriormente, las hormonas tiroideas participan activamente en diversos procesos de neurogénesis y diferenciación en múltiples regiones del sistema nervioso. Ésto incluye al hipotálamo, en donde tienen un efecto sobre el desarrollo del fenotipo dopaminérgico y en donde regulan además la expresión de BDNF. Además los receptores tiroideos se expresan en las células hipotalámicas en desarrollo. Por lo tanto proponemos que la T3 participa en la diferenciación terminal de neuronas TRHérgicas hipotalámicas



OBJETIVOS

General:

Determinar si T3 promueve la diferenciación terminal de neuronas TRHérgicas hipotalámicas *in vitro*.

Específicos:

- Determinar la expresión de TRH en respuesta a T3 en cultivos hipotalámicos en diferentes etapas del desarrollo *in vitro*
- Identificar el patrón de expresión de los receptores tiroideos durante el desarrollo del cultivo hipotalámico.
- Evaluar el efecto de T3 sobre la expresión de los receptores tiroideos en el desarrollo del cultivo hipotalámico
- Identificar la expresión ontogénica de TRH y de los receptores tiroideos *in vivo*
- Determinar la expresión de TAU y CRH en respuesta a T3 en cultivos hipotalámicos



MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) criadas en el bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los animales fueron mantenidos en condiciones de iluminación desde las 7 am y hasta las 7 pm y temperatura de 21 ± 2 °C; y recibieron alimento y agua *ad libitum*. El cuidado de los animales y los protocolos fueron aprobados por el Comité de Ética y Cuidado de Animales del Instituto de Biotecnología, UNAM siguiendo las guías para uso de animales en investigación en neurociencias de la Sociedad de Neurociencias, USA. Se utilizaron ratas macho adultas para los experimentos *in vivo*.

Cultivo celular

Los cultivos primarios hipotalámicos se prepararon de embriones de rata de 17 días de gestación (E17) como se describió previamente (Joseph-Bravo et al., 2002); no se determinó el sexo de los embriones. Brevemente, las ratas gestantes se anestesiaron con pentobarbital (33 mg/kg de peso corporal) y los embriones se removieron individualmente. Para exponer el hipotálamo para su disección y extirpación, se realizó un corte a través de una línea imaginaria desde el borde superior del ojo y el borde superior de la oreja; una vez expuesta el area, el hipotálamo se disecó delimitando su area con el quiasma óptico como límite anterior y los surcos laterales incluyendo los cuerpos mamilares a una profundidad de 2-3 mm evitando el area talámica. Los hipotálamos fueron enzimáticamente disociados con tripsina (Sigma) y la viabilidad celular fue monitorizada por exclusión con azul tripano. Las células fueron sembradas en una densidad de 3000 células / mm² en DMEM suplementado (S-DMEM) con 50 mg/ml de glucosa (Sigma), 2 mM de glutamina (Sigma), 3.3 µg/ml de insulina (Sigma), 1% de antibiótico-antimicótico (GIBCO), 1% de solución de vitaminas (GIBCO) y 10% de suero bovino fetal (FBS; GIBCO). Después de 4 DIV, los cultivos fueron tratados con 10 µM de citosina-D-arabinofuranósido (Sigma). La mitad del medio fue reemplazada cada tercer día con S-DMEM. Los cultivos fueron mantenidos por diferentes periodos de tiempo a 37 °C en un incubador con aire humidificado y CO₂ al 7%. En general los tratamientos con T3 se llevaron a cabo en S-DMEM. Dado que el FBS contiene hormonas tiroideas, la concentración final aproximada de T3 en cultivos control fue de 0.3 nM. Los tratamientos con T3 se



llevaron a cabo con 1 nM a 1 μ M de T3 (Sigma) en 0.01 N de NaOH. Cada cultivo tuvo su propio grupo control con la concentración equivalente de NaOH.

Para los cultivos libres de suero, las células se sembraron en un volumen final de 500 μ l de medio Neurobasal (GIBCO) conteniendo suplemento B27 (GIBCO) y 0.1 μ M de 17 β -estradiol (Sigma). Las fotomicrografías se tomaron en diferentes DIV utilizando un microscopio Diaphot invertido (Nikon) y las imágenes se prepararon utilizando Adobe Photoshop.

Immunoblot

Los análisis de Western blot se llevaron a cabo como se describió previamente (Perez-Martinez and Jaworski, 2005). Brevemente, el tejido hipotalámico congelado se sonicó con un sonicador celular Vibra (Sonic and Materials, Danbury, CT) con 3 pulsos de 10 segundos, en buffer de lisis (25 mM de Hepes, pH 7.7, 150 mM de NaCl, 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de EDTA, 0.5% de Triton X-100, 0.5 mM de DTT, 20 mM de β -glicerofosfato, 1 mM de Na_3VO_4 , 5 mM de NaF, 4 mM de PMSF, 1 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de aprotinina) e incubados por 30 minutos a 4 °C. Los lisados celulares fueron centrifugados a 13,000 x g, por 15 minutos a 4 °C. El contenido de proteína se determinó por ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

Los lisados celulares totales (40 μ g) fueron fraccionados por SDS-PAGE y transferidos a membranas Immobilon-P (Schleicher & Schuell). Las membranas fueron bloqueadas con 5% de leche descremada en buffer Tris salino (TBS; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM de NaCl) seguido por una incubación nocturna a 4 °C con el anticuerpo indicado diluido en TBS con 0.05% de Tween-20 (TBS-T). Después de tres lavados con TBS-T, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado acoplado a peroxidasa de rábano, y los inmunocomplejos se visualizaron por quimioluminiscencia aumentada de acuerdo a las instrucciones del fabricante (kit Lumi-Light^{PLUS}; Roche). Los anticuerpos primarios para Western blot incluyeron anti-TR α 1 policlonal de conejo (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-TR β 1 monoclonal de ratón (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-TR β 2 policlonal de conejo (1:200; Upstate Biotechnology), y anti-actina policlonal de cabra (1:5000; Santa Cruz Biotechnology Inc.).



RT-PCR semicuantitativa

El RNA total se extrajo de tejido hipotalámico congelado o de células por el método de isotiocianato de guanidina como se describió previamente (Perez-Martinez et al., 2001). La transcripción reversa se llevó a cabo con 1 µg de RNA utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en la presencia de oligo (dT)₁₅ como primer, sintetizado en la Unidad de Síntesis Macromolecular del Instituto de Biología, UNAM. La PCR se llevó a cabo en un volumen total de reacción de 50 µl. Las PCRs se realizaron utilizando 50 pmol de los oligonucleótidos sentido y antisentido específicos para TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, TRH, CRH o ciclofilina (Buzzard et al., 2000; Danielson et al., 1988; Jingami et al., 1985; Koenig et al., 1988; Lechan et al., 1986; Mitsuhashi et al., 1988; Thompson et al., 1987), 1 µl de mezcla de dNTP (20 mM; Boehringer) y 1/5 del producto de la reacción de transcripción reversa. Las condiciones de PCR incluyeron un ciclo de temperatura de desnaturalización a 94 °C y extensión a 72 °C. La secuencia de primers, la temperatura de alineamiento para cada par de oligonucleótidos, el número de ciclos de PCR y el tamaño del producto son mostrados en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Parámetros de PCR.

Oligonucleótidos	Secuencias 5'-sentido and 5'-antisentido	Temperatura de alineamiento (°C)	Ciclos de PCR	Tamaño del producto amplificado (pb)	Referencias
TRH	S: 5'- CCCTGGATGGAGTCTGATGT AS: 5'-GACAGCTAGTGAAGGGAACAGG	62	26	358	Lechan et al., 1986
TR α 1	S: 5'- ATGGCCATGGACCTGGTTC AS: 5'- GGGCACTCGACTTTCATGTG	66	25	840	Thompson et al., 1987
TR α 2	S: 5'- ATGGCCATGGACCTGGTTC AS: 5'- GCATTCCGAGAAGCTGCTG	69	27	801	Mitsuhashi et al., 1988
TR β 1	S: 5'- GGTGGTACCAAGTCCACAC AS: 5'- GTTACAATGGGTGCTTGTC	67	34	830	Koenig et al., 1988
TR β 2	S: 5'- CATGGCCCTGAGTCAGTACA AS: 5'- GCACTGGTTTACGGGTGACTT	58	35	292	Buzzard et al., 2000
TAU	S: 5'- GGTGGCAAGGTGCAATAGT AS: 5'- GCCAAGGAAGCAGACACTTC	55	35	404	Suarez-Rodríguez and Belkind-Gerson., 2004
CRH	S: 5'- GCCCCGCGAGCCGTTGAA AS: 5'- GACCGCTCTCCCTCTCCAG	63	30	325	Jingami et al., 1985
Ciclofilina	S: 5'- GGGGAGAAAGGATTTGGCTA AS: 5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC	62	26	259	Danielson et al., 1988

La expresión génica se estimó por cuantificación de RNAm. La tabla indica los parámetros experimentales de RT-PCR para los ocho genes estudiados durante el desarrollo del cerebro de rata.



Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa al 2%, las bandas se tiñeron con bromuro de etidio y se cuantificaron en unidades arbitrarias mediante densitometría asistida por computadora. Para los datos de la ontogenia *in vivo*, la expresión de los RNAm de las isoformas de TR se normalizó a la señal densitométrica de la fracción 18S del RNA, sin realizar RT-PCR. Para el resto de los experimentos, los datos se normalizaron con respecto al gen de ciclofilina que no se regula durante el desarrollo (Al-Bader and Al-Sarraf, 2005).

Presentación de datos

Para los datos de los cultivos primarios, cada experimento consistió de dos a tres réplicas con grupos control y experimental: la n es el número total de platos usados por cada grupo. Los resultados fueron calculados como porcentaje del control o contra el valor de la primera determinación. Los datos se calcularon como promedio $\pm$ desviación estándar y se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis. Las diferencias entre los grupos se analizaron por la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney seguida por una corrección de Bonferroni. Los datos se consideraron significativos cuando $p < 0.05$. En general, los datos correspondieron a por lo menos dos experimentos independientes.



RESULTADOS

Regulación de la expresión del RNAm de TRH por efecto de T3 en función del estadio de desarrollo in vitro

Como una aproximación inicial para explorar la participación de T3 durante la diferenciación del fenotipo TRHérgico, se prepararon cultivos primarios derivados del hipotálamo de ratas de 17 días de gestación, fueron mantenidos en presencia de suero para facilitar la aparición del fenotipo neuronal maduro. Después de 6, 12 o 18 DIV, los cultivos fueron tratados con T3, cosechados y procesados para ensayos de RT-PCR para determinar la expresión de TRH. T3 reguló la expresión de TRH; el efecto difirió de acuerdo al grado de madurez del cultivo. A los 6 DIV, el tratamiento por 1 h con T3 (1 nM a 1 μ M) no reguló la expresión de RNAm de TRH. Sin embargo, se observó un incremento significativo con T3 10 nM a las 12 h de tratamiento (**Fig. 12A, 6 DIV, panel izquierdo y derecho**). Por otra parte, a 1 h de tratamiento, T3 incrementó la expresión de TRH a 12 DIV. Este efecto fue observado a 1 nM, una concentración igual a los niveles séricos de T3 en el ratón adulto (Friedrichsen et al., 2003), 10 nM y 1 μ M (**Fig. 12A, 12 DIV, panel izquierdo**) ($P < 0.0001$). Para determinar la respuesta temporal de la expresión del RNAm de TRH inducida por T3, cultivos de 12 DIV se trataron con 10 nM de T3 y se cosecharon en diferentes tiempos. El efecto estimulador fue solamente observado después de 1 hora de tratamiento; los tratamientos más largos resultaron en un efecto inhibitor (**Fig. 12A, 12 DIV, panel derecho**) ($P < 0.0001$).

Además, para determinar si la regulación de la expresión del RNAm de TRH por T3 depende del grado de maduración del cultivo (**Fig. 12B**), las células mantenidas por 18 DIV fueron tratadas con diferentes dosis de T3 por 1 h. A diferencia del 12 DIV, la expresión del RNAm de TRH se inhibió significativamente en respuesta al tratamiento de T3 (1 nM a 1 μ M) a 18 DIV (**Fig. 12A, 18 DIV, panel izquierdo**) ($P < 0.0001$). Una disminución adicional (a $38 \pm 1.9\%$ de los valores control) se observó con períodos mas largos (12 h) de 10 nM de tratamiento con T3 (**Fig. 12A, 18 DIV, panel derecho**) ($P < 0.0001$).

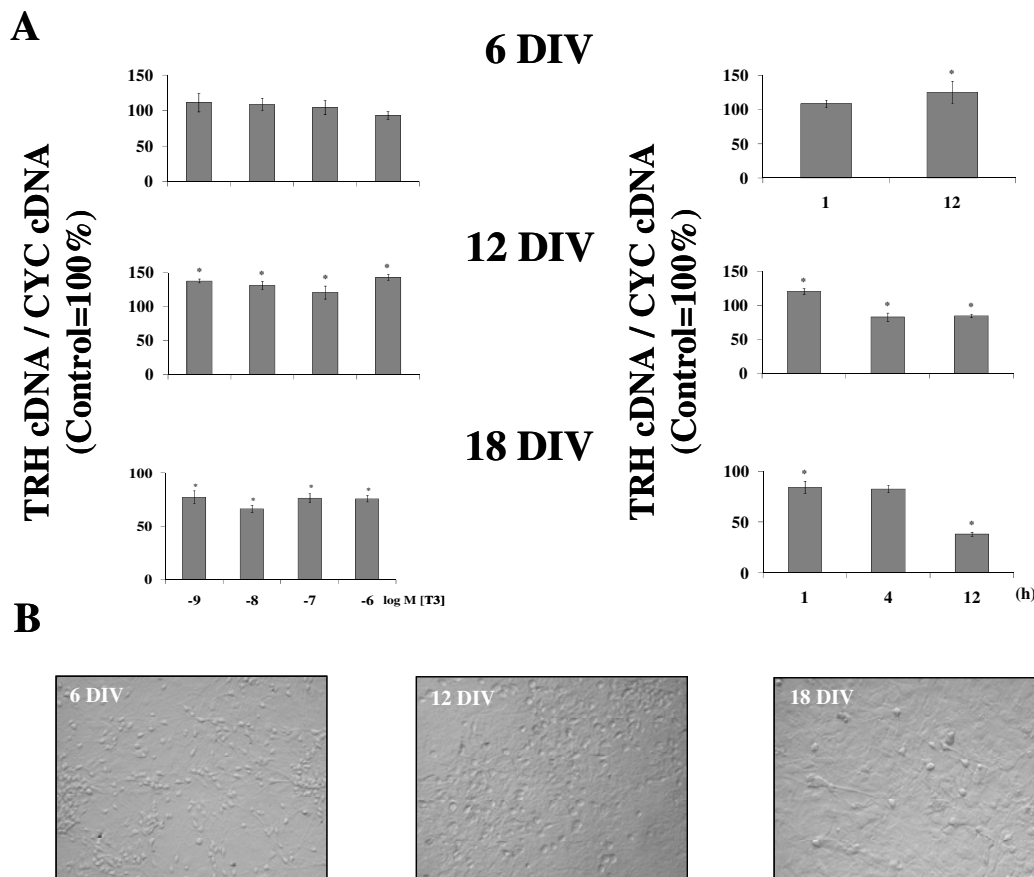


Fig. 12. T3 reguló la expresión de RNAm de TRH de acuerdo al estadio del desarrollo del cultivo celular hipotalámico. Las células fueron mantenidas en medio suplementado con suero. (A) Dosis respuestas (izquierda). Células hipotalámicas fetales cultivadas por 6, 12 y 18 DIV (hileras superior, media e inferior, respectivamente) y tratadas con diferentes dosis de T3 (1 nM a 1 μ M) durante 1 hora. Cinéticas (derecha). Respuesta cinética del RNAm de TRH al estímulo de T3 10 nM a los 6, 12 y 18 DIV (hileras superior, media e inferior, respectivamente). Los niveles relativos de RNAm de TRH se determinaron por RT-PCR y se calcularon como la relación de la señal de cDNA de TRH y la señal de cDNA de ciclofilina (CYC); los valores se expresaron como el porcentaje del control. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes, con 4 a 7 repeticiones cada uno. * $P < 0.05$ diferencia significativa contra el control;. (B) Fotografías mostrando el cultivo celular hipotalámico a 6, 12 y 18 DIV. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio invertido (Nikon) a 10X, con iluminación Hoffman.

Regulación de la expresión del RNAm de TR β 2 durante el desarrollo in vitro

Debido a que uno de los principales mecanismos de regulación de la expresión génica por T3 ocurre a través de la acción de los TRs, investigamos entonces el patrón de expresión de cuatro de los TRs en el cultivo primario hipotalámico. Los transcritos de TR α 1, TR α 2, TR β 1 y TR β 2 estuvieron presentes en los tres tiempos analizados (8, 12 y 18 DIV). A 8 DIV, todas las isoformas estudiadas estuvieron presentes; a partir de aquí la expresión del RNAm de TR α 1, TR α 2, TR β 1 y TR β 2 mostró una tendencia a incrementarse al 12 DIV, después de lo cual (18 DIV) los transcritos de TR α 1, TR α 2 y en menor grado de TR β 1, disminuyeron a niveles iniciales (**Fig. 13**). En contraste,

la expresión de TR β 2 se redujo significativamente a medida que el cultivo se desarrollaba, expresándose tan solo un 10 ± 6 % a los 12 días y 39 ± 5 % a los 18 días, comparado a los valores al 8 DIV (Fig. 13).

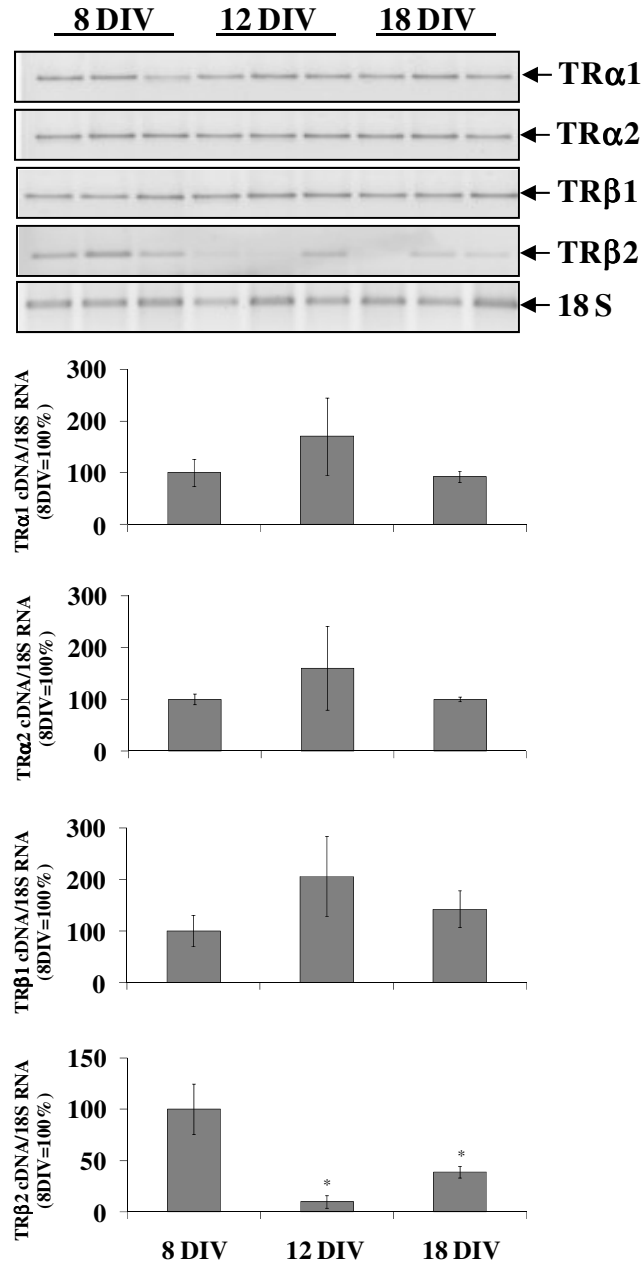


Fig. 13. Los transcritos de receptores de hormona tiroidea estuvieron presentes en las células hipotalámicas en cultivo pero solamente el transcrito de TR β 2 fue regulado en el desarrollo. Las células fueron mantenidas en medio suplementado con suero. Se determinaron por RT-PCR los niveles de RNAm de las isoformas α 1, α 2, β 1 y β 2 de los receptores de hormona tiroidea a los 8, 12 y 18 DIV, se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias y se normalizaron contra la fracción 18S del RNA como control interno. Los valores se presentan como porcentajes con respecto al control interno. Los valores a 8 DIV fueron tomados como el 100%. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes, con 3 a 5 repeticiones cada uno. * $P < 0.05$ diferencia significativa contra 8DIV..

Regulación de la expresión del RNAm de TR α 1 y TR β 2 por efecto de T3 durante el desarrollo *in vitro*

T3 regula la expresión de varios TRs y comoduladores (Clerget-Froidevaux et al., 2004), y por lo tanto puede también regular indirectamente la expresión génica. Para probar la capacidad de T3 para regular la síntesis de TRs bajo nuestras condiciones experimentales, se trataron cultivos de 18 DIV con T3 en concentración 10^{-8} M, por 1 hora y la expresión de los transcritos de las isoformas de los TRs se determinaron por RT-PCR. Aunque las cuatro isoformas se expresaron *in vitro*, solamente los niveles de RNAm de TR α 1 y TR β 2 se regularon positivamente de manera significativa (1.4 veces, respectivamente) en respuesta al tratamiento con T3 (**Fig. 14**) ($P < 0.05$).

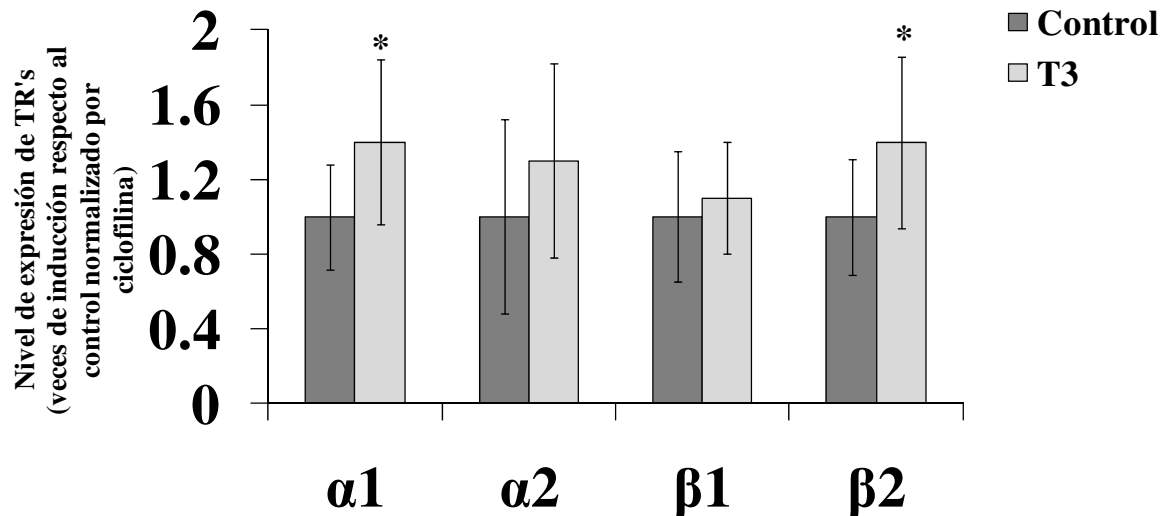


Fig. 14. Los transcritos de TR α 1 y TR β 2 se regularon positivamente por T3 en cultivos de células hipotalámicas. Las células fueron mantenidas en medio suplementado con suero. Cultivos celulares de 18 DIV se trataron con 10 nM de T3 por 1 h y después se determinaron por RT-PCR los niveles de RNAm de las distintas isoformas de receptor tiroideo. Los productos amplificados se cuantificaron por densitometría. Los valores se normalizaron con respecto a los niveles de RNAm de ciclofilina y se expresaron como veces de inducción. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes, con 5 a 7 repeticiones cada uno. * $P < 0.05$ diferencia significativa contra el control;.

Regulación de la expresión del RNAm de TRH por T3 en función de la presencia de suero *in vitro*

Dado que la mayoría de nuestros estudios se llevaron a cabo en la presencia de suero y en vista de que ciertos factores de crecimiento (como FGF y EGF) son señales inhibitoras para la diferenciación neuronal (Garza et al., 1990), probamos si factores del suero interfieren con la acción de T3 sobre la expresión génica de TRH. Los cultivos primarios fueron mantenidos en medio Neurobasal libre de suero, que reduce la proliferación glial pero mantienen a las neuronas



hipotalámicas (Guerra-Crespo et al., 2001; Niquet et al., 2000), e incubadas por diferentes períodos de tiempo antes del tratamiento con T3. La rápida inducción (1 h) de la expresión de TRH por el tratamiento con T3 en cultivos de 12 DIV en presencia de suero (**Fig. 12A**) se retardó hasta las 4h en ausencia de suero (**Fig. 15A**) ($P < 0.05$). Además, el efecto inhibitor observado a los 18 DIV en presencia de suero (**Fig. 12A**) se eliminó en ausencia de suero (**Fig. 15B**). Estos datos sugieren que los factores del suero modulan los efectos de T3 sobre la expresión de TRH.

Trabajos previos han mostrado que la interacción de los TR con ER (ej: ER α) regulan la expresión de genes blanco ya sea, compitiendo por un elemento de respuesta o reclutando proteínas coactivadoras (Scott et al., 1997; Vasudevan et al., 2001a; Vasudevan et al., 2001b; Vasudevan et al., 2001c; Vasudevan et al., 2002; Zhao et al., 2005). Debido a que bajo nuestras condiciones experimentales los tratamientos con T3 fueron inicialmente realizados en presencia de suero que contiene estrógenos (10 nM), probamos si esta hormona podría influenciar la regulación de la expresión del gen de TRH por T3. De nuevo, cultivos hipotalámicos fueron mantenidos en medio Neurobasal suplementado con B27 y con 1×10^{-7} M de 17 β -estradiol y tratadas con T3. Como se mencionó antes en medio Neurobasal, T3 incrementó significativamente la expresión de RNAm de TRH a los 12 DIV después de 4 horas de tratamiento. En presencia de 17 β estradiol, sin embargo, el efecto de T3 fue completamente abolido (**Fig. 15A**). Interesantemente, el efecto inhibitor de T3 observado en los cultivos maduros (18 DIV) en la presencia de suero (**Fig. 12**) fue eliminado en ausencia de suero independientemente de la presencia o no de 17 β estradiol (**Fig. 15B**).

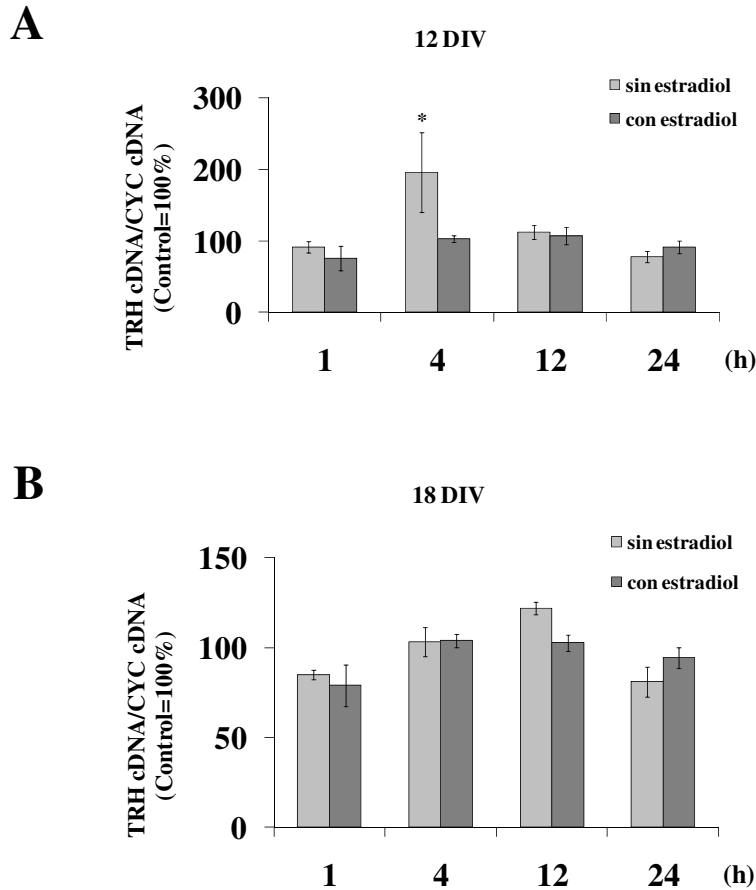


Fig. 15. El 17 β -estradiol reprimió el efecto de T3 sobre los niveles de RNAm de TRH en cultivos primarios de células hipotalámicas en medio libre de suero. Los niveles de RNAm de TRH de cultivos celulares libres de suero tratados con 10 nM de T3 y con 10 nM de 17 β -estradiol (barras oscuras) o sin estradiol (barras claras) por 1, 4, 12 y 24 horas a los 12 DIV (panel superior) y 18 DIV (panel inferior), se determinaron por RT-PCR y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores fueron corregidos contra los niveles de RNAm de ciclofilina que se utilizó como control interno, y fueron expresados como porcentajes respecto al control. Control = 100%. Análisis estadístico por ANOVA, seguido por una determinación LSD. * $p < 0.05$.

Regulación de la expresión del RNAm y de las proteínas de los receptores tiroideos durante la ontogenia hipotalámica

Dado que varios efectos biológicos de T3 son mediados por los TRs y estudios previos han demostrado que T3 promueve la diferenciación neuronal terminal en diferentes áreas del cerebro (Chan and Kilby, 2000), estudiamos la expresión de los TRs *in vivo* durante el desarrollo del hipotálamo de rata. El análisis de RT-PCR reveló que el RNAm de TR β 1 se expresó en niveles bajos en las etapas mas tempranas del desarrollo examinadas (E14-E18). La expresión se incrementó gradualmente, llegando a un pico a los 2 meses (804% comparado al valor en E14), y entonces disminuyó a los 5 meses de edad (406%) (**Fig. 16A**). Similarmente, el RNAm de TR β 2 se expresó en muy bajos niveles en E14 y E16. Se detectó un incremento de 22 veces (comparado a



E14) en el nivel de RNAm de TR β 2 en E20. Un incremento adicional (35 veces comparado a E14) se observó en P0 después de lo cual, el RNAm de TR β 2 se mantuvo en niveles altos hasta la etapa adulta (**Fig. 16A**). Por otra parte, niveles muy bajos de RNAm de TR α 2 se detectaron en las etapas más tempranas del desarrollo examinadas (E14). La expresión se incrementó en E16 (5.1 veces), permaneció estable hasta P0 y entonces disminuyó a los 5 meses de edad a niveles cercanos a los iniciales (**Fig. 16A**). Finalmente, el RNAm de TR α 1 se detectó en todos los momentos examinados. Un ligero incremento se observó en las etapas más tempranas del desarrollo (E16-E18) llegando a un pico en P0 (1.6 veces comparado a E14); los niveles disminuyeron discretamente a los 2-3 meses de edad. A los 5 meses de edad la expresión de RNAm de TR α 1 disminuyó a los niveles observados en E14 (**Fig. 16A**). Los niveles de proteína TR α 1 se regularon de manera similar a los niveles de RNAm (**Fig. 16B**). La expresión gradualmente se incrementó entre E18 y E20, llegando a un pico a P0 (7.5 veces el valor de E17) y entonces disminuyendo suavemente a los 2 y 3 meses de edad (5.8 veces comparado a E17). Un incremento adicional (6.9 veces comparado a E17) se observó a los 5 meses de edad (**Fig. 16B**).

Los niveles de proteína TR β 2 también fueron regulados durante el desarrollo hipotalámico. Niveles bajos de proteína TR β 2 se detectaron temprano en el desarrollo (E17-E19). Sin embargo, un incremento dramático se observó desde P0 (2.7 veces comparado a E17) a los 3 meses de edad (42 veces comparado a E17). Por el contrario, los niveles de proteína TR β 1 no fueron regulados durante el desarrollo del hipotálamo pero se observó una tendencia a incrementarse en la etapa adulta (**Fig. 16B**). Una observación interesante es el hecho de que la expresión de RNAm que codifica para la isoforma TR α 1 coincidió cronológicamente con la expresión de TRH en el hipotálamo de la rata. La expresión de RNAm de TRH inició en E14 en el diencéfalo de la rata (Burgunder and Taylor, 1989). De acuerdo a los estudios previos (Perez-Martinez et al., 2001), observamos que la expresión de TRH se reguló durante el desarrollo del hipotálamo. La expresión de RNAm de TRH inició en E14; se incrementó lentamente durante los siguientes días llegando a un pico a los 2 meses de edad; y a partir de aquí se observó una ligera disminución (**Fig. 16C**).

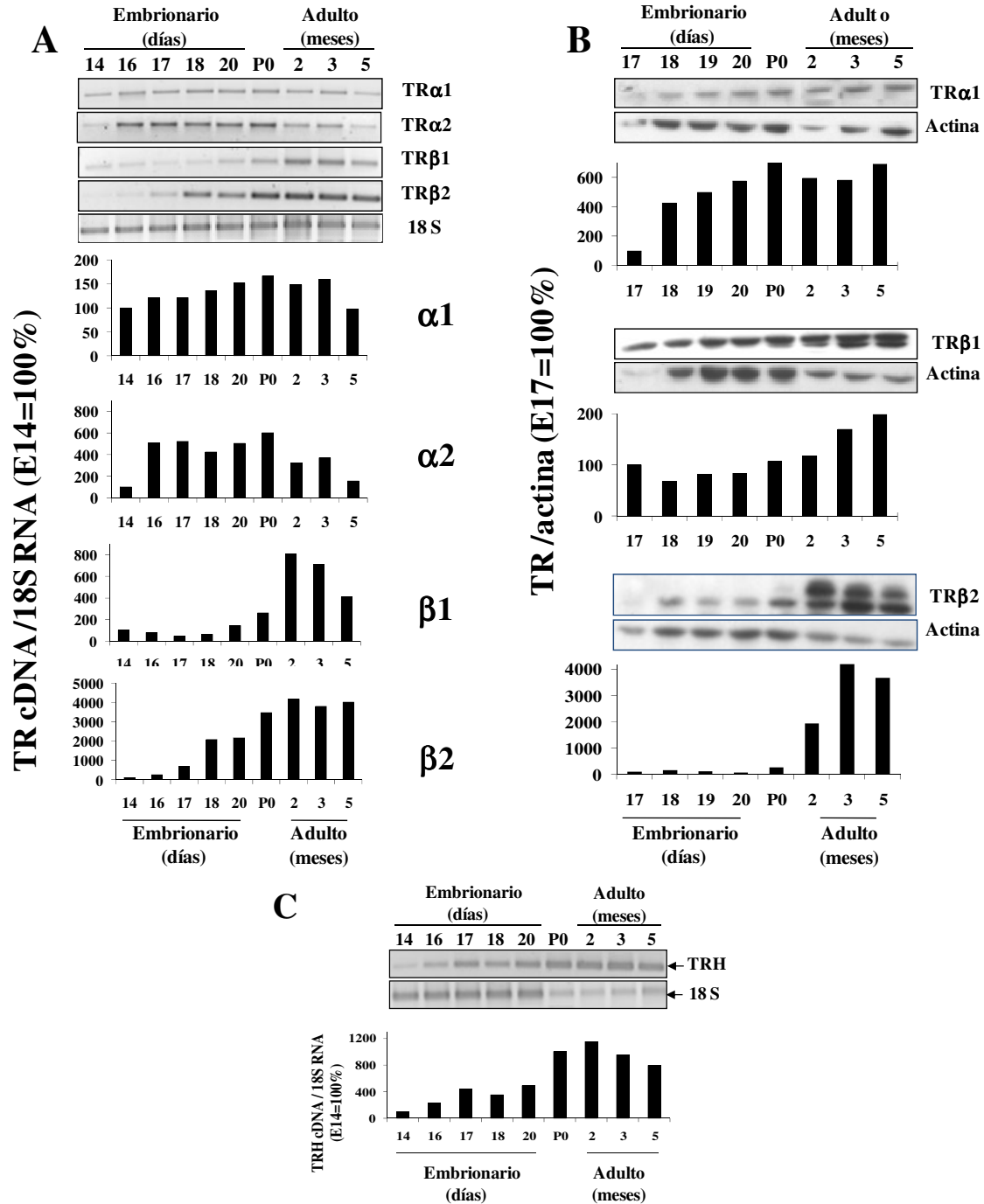


Fig. 16. Los transcritos y proteínas de receptores de hormona tiroidea fueron regulados durante la ontogenia hipotalámica. (A) Los niveles de RNAm de las isoformas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ de receptores de hormona tiroidea del hipotálamo de embriones de ratas a los 14, 16, 17, 18 y 20 días de gestación (E), así como al nacimiento (P0) y en los meses 2, 3 y 5 de la etapa adulta se determinaron por RT-PCR, se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias y se corrigieron contra la fracción 18S del RNA. Los valores se representan como porcentajes. E14 se tomó como control=100%. (B) Los niveles de proteína de las isoformas $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$ de receptores de hormona tiroidea del hipotálamo de embriones de ratas de 17, 18 y 20 días de gestación, así como al nacimiento (P0) y en los meses 2, 3 y 5 de la etapa adulta (A) se determinaron por Western blot y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias y se corrigieron con actina. Los valores se representan como porcentajes. E17 fue tomada como control=100%. (C) Los niveles de RNAm de TRH del hipotálamo de embriones de ratas de 14, 16, 17, 18 y 20 días de gestación, así como al nacimiento (P0) y en los meses 2, 3 y 5 de la etapa adulta se determinaron por RT-PCR, se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias y se corrigieron contra la fracción 18S del RNA. Los valores se representan como porcentajes. E14 se tomó como control=100%. Se muestran los promedios de dos experimentos independientes, n=2.

Respuesta del RNAm de TAU al efecto de T3 in vitro

Dado que TAU es una proteína requerida para el crecimiento axonal (Nunez et al., 1992) y T3 regula su expresión en la neocorteza y el cerebelo en desarrollo (Aniello et al., 1991; Cuadrado et al., 2002) determinamos si T3 podría regular la expresión de TAU como parte de un efecto general sobre el programa de diferenciación neuronal. Los cultivos en diferente grado de maduración (12 y 18 DIV) se trataron con T3 y la expresión de TAU como un marcador de diferenciación neuronal terminal, se determinó mediante ensayos de RT-PCR. En cultivos de 12 DIV, observamos un rápido incremento (4 h) de la expresión de TAU y después se observó una disminución gradual hasta alcanzar una disminución significativa a las 24 h (**Fig 17**). En contraste, en cultivos maduros (18DIV) observamos una tendencia a incrementar la expresión de TAU en períodos más largos de tratamiento con T3 (24 h) (**Fig 17**), sugiriendo que a los 18 DIV las neuronas inmaduras constituyen una población menor.

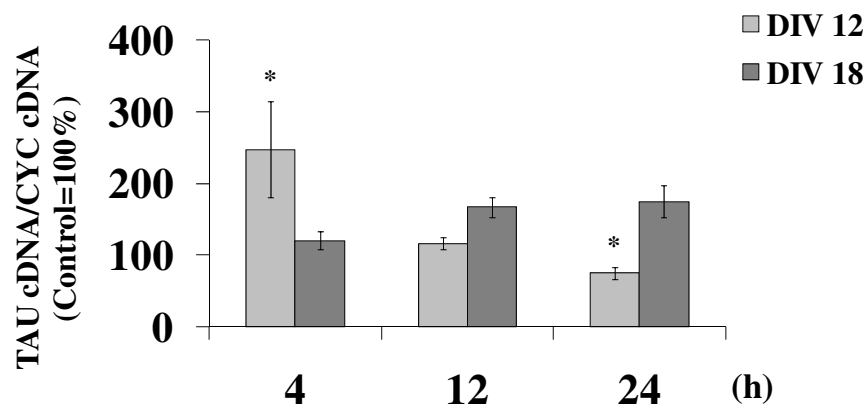


Fig. 17. Respuesta de RNAm de TAU a T3 en cultivos hipotalámicos inmaduros. Células hipotalámicas fetales mantenidas en medio suplementado con suero por 12 y 18 DIV fueron tratadas con 10 nM de T3 por 1, 12 y 24 h. Los niveles relativos de RNAm de TAU se determinaron por RT-PCR y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores se corrigieron contra los niveles de RNAm de ciclofilina (CYC) como control interno y se expresaron como un porcentaje del control. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes, con tres repeticiones cada uno. * $P < 0.05$ diferencia significativa contra el control.

Respuesta del RNAm de CRH al efecto de T3 in vitro

En vista del hecho que las neuronas que sintetizan TRH y CRH, son generadas durante periodos parcialmente sobrelapados de tiempo (Baram and Lerner, 1991; Markakis, 2002), y los receptores tiroideos son expresados dentro del hipotálamo (este trabajo), las neuronas TRHérgicas y CRHérgicas pueden compartir mecanismos reguladores durante el desarrollo, incluyendo una respuesta a hormona tiroidea. Por lo tanto, determinamos si los efectos de T3 fueron específicos para TRH, o podrían afectar un espectro neuropeptidérgico más amplio. Los cultivos mantenidos en medio suplementado con suero fueron tratados a los 12 y 18 DIV con T3. La expresión de RNAm

de CRH se evaluó en diferentes momentos. En contraste al hecho de que la expresión de RNAm de TRH fue significativamente inhibida a 18 DIV (**Fig. 12**), los niveles de expresión de CRH se regularon positivamente en cultivos maduros (18 DIV) después de 12 horas de tratamiento con T3 (**Fig. 18**) ($P < 0.05$). Sin embargo, el tratamiento con T3 no tuvo efecto sobre la expresión de RNAm de CRH en cultivos menos maduros (**Fig. 18**).

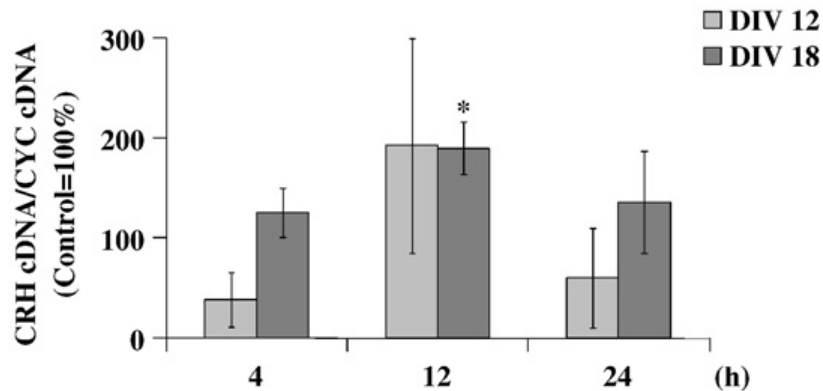


Fig. 18. Respuesta de RNAm de CRH a T3 en cultivos hipotalámicos inmaduros. Células hipotalámicas fetales mantenidas en medio suplementado con suero fueron tratadas con 10 nM de T3 y cosechadas a los 12 y 18 DIV en los puntos indicados. Los niveles relativos de RNAm de CRH se determinaron por RT-PCR y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores se corrigieron contra los niveles de RNAm de ciclofilina (CYC) como control interno y se expresaron como un porcentaje del control. Se muestran los resultados de dos experimentos independientes, con tres repeticiones cada uno. * $P < 0.05$ diferencia significativa contra el control.



DISCUSION

La identidad de los neurotransmisores que una neurona sintetizará y sus estructuras blanco son determinados durante la fase terminal del programa de diferenciación. Este proceso es regulado por señales extracelulares que llevan a la inducción de factores de transcripción y expresión específica de genes. Las hormonas están entre los factores extracelulares que inducen la expresión de un fenotipo particular (Gahr, 2004; Kalb and Hockfield, 1992; Leader et al., 2006).

Dentro del hipotálamo neuroendocrino, las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas controlan el eje HHT. La transcripción de TRH en el PVN hipotalámico adulto está sujeta a la regulación por hormonas tiroideas (Koller et al., 1987; Segerson et al., 1987). *In vivo*, la regulación negativa por T3 está mediada por la isoforma TR β 2 (Ishii et al., 2004; Langlois et al., 1997), pero también en menor medida por la isoforma TR β 1 (Dupre et al., 2004). A pesar de la reconocida importancia de T3 sobre la regulación del eje HHT, se desconoce si T3 juega un papel en el desarrollo de la expresión de RNAm de TRH en hipotálamo. Hasta ahora, solo un estudio ha propuesto que T3 promueve la liberación de TRH en neuronas hipotalámicas en cultivo (Loudes et al., 1983).

Aprovechamos el modelo de los cultivos primarios derivados del hipotálamo de rata de 17 días de gestación y nos enfocamos en el efecto de T3 sobre la expresión del gen de TRH durante la fase terminal de la diferenciación neuronal. T3 reguló la expresión de RNAm de TRH. Interesantemente, los efectos mediados por T3 dependieron de la madurez del cultivo hipotalámico. Los cultivos inmaduros (12 DIV) demostraron un incremento en la expresión de TRH mientras que se observó un efecto inhibitorio en cultivos maduros (18 DIV).

El aumento inducido por T3 de la expresión de TRH sobre los cultivos inmaduros puede ser debido a un clásico efecto genómico, ya sea directo sobre el promotor de TRH o indirecto. Si este es el caso, ¿cual es la isoforma de los TR involucrada? Teóricamente, tanto el receptor TR α 1 como el TR β 2 podrían participar, porque ambos son expresados durante el periodo de inicio (E14-E16) de la expresión de RNAm de TRH *in vivo*. Sin embargo, TR β 2 es expresado en niveles más bajos entre E14-E17 comparado a etapas más tardías del desarrollo (E18-adulto). TR α 1, por otra parte, se expresa constantemente durante todas las etapas del desarrollo (E14-adulto) *in vivo*.

TR α 1 es expresada ampliamente en el cerebro desde los estadios embrionarios tempranos y es también la principal isoforma expresada en células troncales embrionarias (ES). Estudios previos



han puesto en evidencia un papel en la neurogénesis (Lemkine et al., 2005) que es además apoyado por la demostración que TR α 1 media la diferenciación de tipo neuronal en las ES y en la línea celular PC12 (Munoz et al., 1993). Estas observaciones, junto con la presente demostración que la expresión *in vivo* del RNAm de TR α 1 (pero no de TR β 2) coincidió cronológicamente con la expresión del RNAm de TRH en el hipotálamo y el efecto estimulador de T3 sobre los niveles de RNAm de TRH en cultivos inmaduros, sugiere que TR α 1 puede contribuir al aumento temprano de la expresión de TRH. Sin embargo, dado que no hay evidencia respecto a que el promotor de TRH tiene un elemento de respuesta positivo a hormona tiroidea (TRE), el efecto de TR α 1 podría ser también indirecto.

Los patrones de expresión temporal de TR α 1 y TR β 2 (este trabajo) y la presencia de un TRE putativo en la región promotora de TR β 2 (**Tabla 3**) (Suen et al., 1994), sugieren que TR α 1 podría regular positivamente la expresión de TR β 2 durante las etapas tempranas del desarrollo. Esta hipótesis es análoga a la conclusión de estudios previos demostrando que la expresión de TR β 1 es directamente regulada por TR α 1 a través de dos elementos de respuesta a hormona tiroidea (TREs) presentes sobre el promotor de TR β 1 humano en una manera dependiente de ligando (Suzuki et al., 1994). En *Xenopus*, T3 regula positivamente el RNAm de BTEB1 y esta proteína a su vez se une *in vitro* a secuencias ricas en GC en la región proximal de promotor de TR β A (Bagamasbad et al., 2007).

Tabla 3. Elementos putativos de respuesta a hormona tiroidea y estrógenos en el promotor de TR β 2 en mamíferos

Organismo	Gene ID	Secuencias
Homo sapiens	<u>7068</u>	-355 ctgggtgg aggtc attcctacctgcctgc-326
Macaca mulatta	<u>699969</u>	-317 ctgggtgg aggtc attcctacctgcctgc-288
Pan troglodytes	<u>470771</u>	-355 ctgggtgg aggtc attcctacctgcctgc-326
Mus musculus	<u>21834</u>	-345 ccaagtac agacc attcctacctgcctgc-316
Rattus norvegicus	<u>24831</u>	-372 tcaaggag aggcca tttctacctgcctgc-343
Equus caballus	<u>100051615</u>	-351 ctgggtgg aggtc atccctacctgcctgc-322
Canis lupus familiaris	<u>403599</u>	-348 cggggtg atggtc atccctacctgcctgc-319

Análisis por computadora de la región 5'-UTR de TR β 2 mostró la presencia de elementos putativos de respuesta a hormona conservados entre diferentes organismos. Las secuencias en negrita resaltan los TRE (Suen et al., 1994) y las letras en itálicas denotan los ERE. Las posiciones señaladas están referidas al sitio de inicio de la transcripción



Esto está de acuerdo con los presentes datos que demuestran que mientras el perfil de expresión de TR β 2 se sostiene *in vivo*, su expresión disminuye en cultivos a largo plazo deprivados de T3 y que la adición de esta hormona al cultivo indujo la expresión de TR α 1 y TR β 2.

El tratamiento a largo plazo con T3 inhibió la expresión de TRH en cultivos de 12 DIV. Esto podría facilitarse por una regulación positiva de TR β 2 mediada por TR α 1. Adicionalmente, TR β 1 puede también inhibir la expresión de TRH (Dupre et al., 2004). Por lo tanto, TR β 1 y β 2 podrían juntos contribuir al efecto inhibitorio de T3 sobre la expresión de TRH en este estadio de desarrollo del cultivo (12 DIV). Interesantemente, este efecto correlaciona en el tiempo con el inicio de la retroalimentación negativa que las hormonas tiroideas ejercen sobre los niveles de RNAm de TRH en el PVN (Taylor et al., 1990a). Los ratones que carecen de los genes individuales de TRs no tienen mayores defectos en la función del eje HHT, posiblemente por un mecanismo compensatorio entre los TRs. En contraste, los ratones TR α 1^{-/-} β ^{-/-} muestran niveles incrementados de RNAm de TRH en el PVN hipotalámico (Calza et al., 2000). Ésto puede resultar de la pérdida de la retroalimentación negativa mediada por TR β 2 sobre la expresión de TRH. Sin embargo, si T3 regula la expresión de TR β 2 y TRH a través de TR α 1 durante el desarrollo del hipotálamo es todavía una pregunta abierta.

Por otra parte, los cultivos maduros (18 DIV) demostraron una rápida disminución (1 h) en la expresión del RNAm de TRH después del tratamiento con T3. Dado que a los 18 DIV el cultivo consiste básicamente de neuronas maduras (Perez-Martinez et al., 2001), en esta etapa un incremento dependiente de T3 en la expresión de TR β 2 puede contribuir a contrabalancear la acción de TR α 1. Esto es particularmente interesante en términos de cambios en el desarrollo reportados para T4/T3 sérica *in vivo*. Los niveles de hormonas tiroideas séricas se incrementan gradualmente durante el período perinatal y entonces disminuyen alrededor de P15 en el ratón y la rata (Zoeller et al., 2000). Dado que 18 DIV corresponde aproximadamente a P15, de acuerdo a la correlación en la expresión de RNAm de TRH *in vivo* en *in vitro* (Perez-Martinez et al., 2001), el cambio entre un efecto positivo a una retroalimentación negativa de T3 sobre la expresión de TRH puede estar relacionado a cambios en los niveles circulantes de hormonas tiroideas.

Aunque la mayoría de la literatura apoya la idea de que las hormonas tiroideas actúan predominantemente a través de un mecanismo genómico, no podemos descartar la posibilidad de que el efecto positivo observado en el presente estudio resultó de un efecto no genómico. Recientemente, la integrina α 5 β 3 ha sido descrita como el receptor de superficie celular para



hormonas tiroideas (Bergh et al., 2005; Davis et al., 2005). Esta interacción conduce a que la vía de señalización mediada por la participación de la integrina, active a la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK-ERK1/2) (Davis et al., 2008). Consecuentemente, la fosforilación de serinas de TR β 1 dependiente de ERK1/2 resulta en actividad transcripcional (desrepresión) debido al desprendimiento de las proteínas correpresoras y al reclutamiento de los coactivadores (Davis et al., 2000). Similarmente, la fosforilación del receptor nuclear de estrógenos α 1 por una vía dependiente de MAPK ocurre por la activación dependiente de hormonas tiroideas que actúan en la superficie celular (Tang et al., 2004). Recientemente se ha descrito una asociación en el citosol entre el TR β ligado a hormona tiroidea y PI3K, lo cual activa la vía de señalización por PI3K induciendo la expresión del gen de stanniocalcina-1 (STC-1), mostrando un ejemplo mas de acción extranuclear de las hormonas tiroideas (Moeller et al., 2010). Por lo tanto, la señalización por hormonas tiroideas puede involucrar una interfase entre mecanismos de acción genómicos y no genómicos, que podrían indicar inclusive efectos diferenciales de las hormonas tiroideas sobre diversos fenómenos celulares (p. ej: angiogénesis o tumorigénesis) (Davis et al., 2009) Nosotros hemos demostrado recientemente que la actividad de MAPK cinasa regula los niveles de RNAm de TRH en cultivos primarios de células hipotalámicas (Cote-Velez et al., 2008; Ubieta et al., 2007). Se requieren estudios adicionales para clarificar si MAPK puede influenciar el efecto positivo de T3 sobre los niveles de RNAm de TRH.

Los efectos de T3 sobre la expresión de TRH fueron abolidos o retrasados en ausencia de suero. Estos resultados sugieren que los factores del suero modulan el efecto estimulador de T3 sobre la maduración de la expresión de TRH, y son críticos para la aparición de la retroalimentación negativa. Estudios previos en nuestro grupo han mostrado que la expresión de TRH es regulada positivamente en presencia de suero (Pérez-Martínez, L., Charli, J.-L- y Joseph-Bravo, P., resultados no publicados). Es tentador especular que el factor de respuesta al suero está involucrado en tal regulación, como se ha reportado para la expresión del gen SM22 (Qiu et al., 2003). Además, el retardo en el efecto estimulador de T3 en cultivos libres de suero de 12 DIV podrían resultar de la capacidad de los TRs para interactuar con moléculas correpresoras; ésto podría ser activado por ejemplo por el factor de crecimiento epidérmico (Hong et al., 1998), el cual está presente en el suero. En un intento por rescatar los efectos mediados por T3 sobre la expresión de TRH, se añadió 17 β estradiol al medio de cultivo en ausencia de suero. Sorprendentemente, los efectos inducidos mediados por T3 en cultivos de 12 DIV fueron reprimidos en la presencia de estradiol. Una comunicación cruzada entre las vías de señalización de T3 y estrógenos ya se ha descrito. Los estrógenos como las hormonas tiroideas afectan la expresión génica al unirse a elementos de



respuesta específicos a estrógenos (ERE) presentes en la región promotora de los genes blanco (Vasudevan et al., 2001a; Vasudevan et al., 2001b; Vasudevan et al., 2001c; Vasudevan et al., 2002; Zhao et al., 2005). Dependiendo del contexto celular, la comunicación cruzada T3-estrógenos ocurre por unión competitiva al ERE o por secuestro de cofactores (Scott et al., 1997; Zhao et al., 2005). Por lo tanto, es posible que bajo nuestras condiciones experimentales los receptores de estrógeno puedan interferir con la señalización por TRs al competir por TRE sobre el promotor de TRH o por la interacción proteína-proteína reclutando complejos correpresores. Adicionalmente, ha sido demostrado que los estrógenos regulan la expresión génica a través de un efecto distante mediante la remodelación de la cromatina en una manera intercromosomal (Nunez et al., 2008).

Dado que la proteína TAU es requerida para crecimiento axonal (Nunez et al., 1991; Nunez et al., 1992) y T3 regula su expresión en la neocorteza y cerebelo en desarrollo (Aniello et al., 1991; Cuadrado et al., 2002), determinamos si T3 podría regular la expresión de TRH como parte de un efecto general sobre el programa de diferenciación neuronal. Nuestros resultados sugieren que T3 puede ejercer un efecto generalizado sobre la maduración de los fenotipos neuronales hipotalámicos, por lo tanto resultando en un incremento en la expresión del RNAm de TAU. Este efecto fue observado en cultivos en proceso de maduración (12 DIV) (Couchie et al., 1986; Ferreira et al., 1989) y fue rápida y transitoria, seguida por una disminución significativa a las 24 horas. Este efecto inhibitorio podría estar asociado con un mecanismo neuroprotector para evitar la acumulación de depósitos de TAU como ocurre en las enfermedades neurodegenerativas (Cuadrado et al., 2002; Giannakopoulos et al., 1997; Storey and Cappai, 1999).

Datos previos han sugerido que T3 participa en el programa de diferenciación neuronal general regulando la expresión de marcadores neuronales. Sin embargo, la señalización por T3 podría no tener la misma influencia espacio-temporal para regular la expresión de cada uno de los genes de neurotransmisores en particular. De acuerdo a esto, mostramos que la regulación de la expresión de CRH por T3 fue distinta de la observada para la expresión de TRH. No obstante, un espectro más amplio de acción de T3 sobre otros fenotipos neuroendocrinos no puede descartarse. Estudios previos han mostrado que la maduración de las neuronas dopaminérgicas hipotalámicas es aumentada por T3 (Puymirat et al., 1983).

La suplementación en el momento adecuado de una concentración apropiada de T3 es determinante para el desarrollo normal del cerebro. Los datos que nosotros presentamos sugieren que T3 juega un papel clave no solamente sobre la función del eje HHT sino también sobre su desarrollo. El mecanismo que media el efecto temprano de T3 sobre la expresión hipotalámica de



TRH es desconocido. Entre varias posibilidades alternativas, T3 puede promover la expresión de TRH a través de la activación de TR α 1. Además, TR α 1 puede aumentar la expresión de TR β 2 que, en estadios tardíos, podría regular negativamente la expresión de TRH. Por lo tanto, un balance adecuado en tiempo y concentración de las isoformas de TR puede determinar el punto de ajuste para la expresión de TRH para regular consecuentemente los niveles de hormonas tiroideas (**Fig. 19**). Si un desbalance durante el desarrollo en las isoformas de TR neuroendocrinos puede resultar en enfermedades neurológicas (ej: ADHD, obesidad, anorexia nerviosa, hipotiroidismo subclínico, etc) (Reinehr et al., 2008; Siesser et al., 2005; Siesser et al., 2006) es un tema que requiere atención futura.

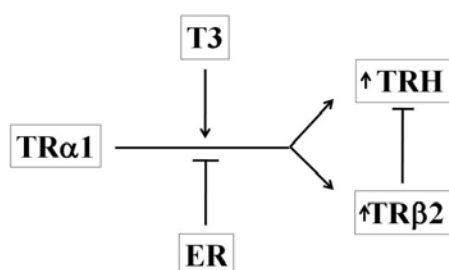


Fig. 19. Modelo de inducción de TR α 1 dependiente de T3 sobre la expresión de TRH y TR β 2. Modulación por estradiol y TR β 2. La expresión de TRH es atribuible durante el desarrollo a TR α 1 ligada por T3. Debido a los elementos putativos de respuesta a hormona tiroidea en su promotor y a la aparición tardía en la gestación, el incremento en la expresión de TR β 2 también se postula como un efecto de TR α 1. La acción del estradiol sobre TRH parece ser represiva e interactuar con TR α 1 ligado a T3 lo cual podría liberar la represión mediada por estradiol y ejercer una inducción. El incremento de TR β 2 inducido por TR α 1 actúa como una señal inhibitoria sobre la expresión de TRH, estableciendo un punto de control sobre el sistema tiroideo a través de la retroalimentación negativa después del estímulo por hormona tiroidea.



CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos concluimos que *in vitro* y en respuesta al efecto de hormonas tiroideas, específicamente de T3, la regulación de la expresión del RNAm de TRH está en función del grado de madurez de las neuronas TRHérgicas hipotalámicas y que este efecto se asocia a una regulación de la expresión de sus propios receptores. Por otra parte, los datos obtenidos apoyan la idea de que en nuestro modelo de estudio existen factores en el suero con el que se suplementa el medio de cultivo, que modulan la actividad de las hormonas tiroideas sobre la regulación de la expresión de TRH.

Por otra parte de acuerdo a lo observado entre la expresión de los RNAm de TRH y CRH, concluimos que las hormonas tiroideas afectan de diferente manera *in vitro* los programas de diferenciación celular en función de cada fenotipo neuroendocrino.



PERSPECTIVAS

En vista de que una de las propuestas derivadas de este trabajo se refiere al papel de TR α 1 como la isoforma de receptor tiroideo involucrada en la expresión de TRH, así como de TR β 2 durante el desarrollo de las células TRHérgicas del hipotálamo, resultaría interesante apagar la expresión de TR α 1 en los cultivos en diferentes etapas de desarrollo para probar los postulados que se mencionan. De manera similar, inhibiendo la expresión de TR β 1 y TR β 2 permitiría probar si se mantiene la inhibición de la expresión de TRH que se produce en respuesta a T3 en cultivos maduros (18DIV) atribuible a tales isoformas.

Por otra parte, una transfección de la región promotora del TR β 2 unida a un gen reportero sería una herramienta adecuada para demostrar de una manera directa si su expresión puede modularse en función del efecto de TR α 1, además de que la delección de los sitios putativos de respuesta a hormonas tiroideas (TRE) y estrógenos (ERE), permitiría identificar los sitios a través de los cuales podría ocurrir este efecto.

Además de establecer con precisión la identidad de las isoformas de receptores tiroideos involucradas en el desarrollo del fenotipo TRHérgico en hipotálamo y la coordinación temporal de las mismas, persiste la interrogante respecto al papel de la señalización extranuclear de las hormonas tiroideas frente al clásico efecto genómico, por lo tanto una estrategia para demostrar o descartar esta función sería el de bloquear la vía de señalización originada en la integrina membranal α 5 β 3, que como se ha sugerido podría pasar a través de la vía de MAPK-ERK1/2, o alternativamente bloquear la señalización de la vía de PI3K la cual al parecer también involucraría la asociación a receptores tiroideos en el citosol y todo ello para descartar el efecto no genómico de T3.

De manera interesante, recientemente se ha reportado que en forma similar a como ocurre con TRH en el PVN, las hormonas tiroideas también ejercen una retroalimentación negativa en las mismas neuronas TRHérgicas del PVN pero sobre la expresión del receptor de la melanocortina tipo 4 (MC4R), un elemento clave en la vía energética asociada a leptina (Decherf et al., 2010), por lo que resultaría interesante cuestionarse si la exploración de este rasgo fenotípico (además de la expresión de TRH) brindaría información adicional sobre el papel de las hormonas tiroideas en el desarrollo de estas células del hipotálamo neuroendocrino.



REFERENCIAS

- Abel, E.D., Ahima, R.S., Boers, M.E., Elmquist, J.K., Wondisford, F.E., 2001. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest.* 107, 1017-23.
- Abel, E.D., Moura, E.G., Ahima, R.S., Campos-Barros, A., Pazos-Moura, C.C., Boers, M.E., Kaulbach, H.C., Forrest, D., Wondisford, F.E., 2003. Dominant inhibition of thyroid hormone action selectively in the pituitary of thyroid hormone receptor-beta null mice abolishes the regulation of thyrotropin by thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 17, 1767-76.
- Al-Bader, M.D., Al-Sarraf, H.A., 2005. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res Dev Brain Res.* 156, 38-45.
- Alonso, M., Goodwin, C., Liao, X., Page, D., Refetoff, S., Weiss, R.E., 2007. Effects of Maternal Levels of Thyroid Hormone (TH) on the Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Set Point: Studies in TH Receptor {beta} Knockout Mice. *Endocrinology.* 148, 5305-12.
- Alvarez-Dolado, M., Ruiz, M., Del Rio, J.A., Alcantara, S., Burgaya, F., Sheldon, M., Nakajima, K., Bernal, J., Howell, B.W., Curran, T., Soriano, E., Munoz, A., 1999. Thyroid hormone regulates reelin and *dab1* expression during brain development. *J Neurosci.* 19, 6979-93.
- Aniello, F., Couchie, D., Bridoux, A.M., Grippo, D., Nunez, J., 1991. Splicing of juvenile and adult tau mRNA variants is regulated by thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 4035-9.
- Bagamasbad, P., Howdeshell, K.L., Sachs, L.M., Demeneix, B.A., Denver, R.J., 2007. A role for basic transcription element binding protein 1 (*bteb1*) in the autoinduction of thyroid hormone receptor beta. *J Biol Chem.*
- Baram, T.Z., Lerner, S.P., 1991. Ontogeny of corticotropin releasing hormone gene expression in rat hypothalamus--comparison with somatostatin. *Int J Dev Neurosci.* 9, 473-8.
- Bergh, J.J., Lin, H.Y., Lansing, L., Mohamed, S.N., Davis, F.B., Mousa, S., Davis, P.J., 2005. Integrin $\alpha v \beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology.* 146, 2864-2871.
- Bongers-Schokking, J.J., Koot, H.M., Wiersma, D., Verkerk, P.H., de Muinck Keizer-Schrama, S.M., 2000. Influence of timing and dose of thyroid hormone replacement on development in infants with congenital hypothyroidism. *J Pediatr.* 136, 292-7.
- Bongers-Schokking, J.J., 2001. Pre- and postnatal brain development in neonates with congenital hypothyroidism. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 14 Suppl 6, 1463-8.
- Bouret, S., Chuoi-Mariot, M.T., Prevot, V., Croix, D., Takumi, T., Jegou, S., Vaudry, H., Beauvillain, J.C., Mitchell, V., 2001. Evidence that TGF beta may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus. *Endocrinology.* 142, 4055-65.
- Bouret, S., De Seranno, S., Beauvillain, J.C., Prevot, V., 2004. Transforming growth factor beta1 may directly influence gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamus. *Endocrinology.* 145, 1794-801.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-54.
- Bradley, D.J., Towle, H.C., Young, W.S., 3rd, 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J Neurosci.* 12, 2288-302.
- Briscoe, J., Pierani, A., Jessell, T.M., Ericson, J., 2000. A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. *Cell.* 101, 435-45.



- Builee, T.L., Hatherill, J.R., 2004. The role of polyhalogenated aromatic hydrocarbons on thyroid hormone disruption and cognitive function: a review. *Drug Chem Toxicol.* 27, 405-24.
- Burgunder, J.M., Taylor, T., 1989. Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology.* 49, 631-40.
- Bury, F., Carre, J.L., Vega, S., Ghandour, M.S., Rodriguez-Pena, A., Langley, K., Sarlieve, L.L., 2002. Coexpression of thyroid hormone receptor isoforms in mouse oligodendrocytes. *J Neurosci Res.* 67, 106-13.
- Buzzard, J.J., Morrison, J.R., O'Bryan, M.K., Song, Q., Wreford, N.G., 2000. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod.* 62, 664-9.
- Calza, L., Forrest, D., Vennstrom, B., Hökfelt, T., 2000. Expression of peptides and other neurochemical markers in hypothalamus and olfactory bulb of mice devoid of all known thyroid hormone receptors. *Neuroscience.* 101, 1001-1012.
- Clerget-Froidevaux, M.S., Seugnet, I., Demeneix, B.A., 2004. Thyroid status co-regulates thyroid hormone receptor and co-modulator genes specifically in the hypothalamus. *FEBS Lett.* 569, 341-5.
- Cote-Velez, A., Perez-Martinez, L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2008. The PKC and ERK/MAPK pathways regulate glucocorticoid action on TRH transcription. *Neurochem Res.* 33, 1582-91.
- Couchie, D., Faivre-Bauman, A., Puymirat, J., Guilleminot, J., Tixier-Vidal, A., Nunez, J., 1986. Expression of microtubule-associated proteins during the early stages of neurite extension by brain neurons cultured in a defined medium. *J Neurochem.* 47, 1255-61.
- Courtin, F., Zroui, H., Lamirand, A., Li, W.W., Mercier, G., Schumacher, M., Goascogne, C.L., Pierre, M., 2005. Thyroid hormone deiodinases in the central and peripheral nervous system. *Thyroid.* 15, 931-42.
- Cuadrado, A., Garcia-Fernandez, L.F., Imai, T., Okano, H., Munoz, A., 2002. Regulation of tau RNA maturation by thyroid hormone is mediated by the neural RNA-binding protein musashi-1. *Mol Cell Neurosci.* 20, 198-210.
- Cuevas, E., Auso, E., Telefont, M., Morreale de Escobar, G., Sotelo, C., Berbel, P., 2005. Transient maternal hypothyroxinemia at onset of corticogenesis alters tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *Eur J Neurosci.* 22, 541-51.
- Chan, S., Kilby, M.D., 2000. Thyroid hormone and central nervous system development. *J Endocrinol.* 165, 1-8.
- Chan, S., Kachilele, S., McCabe, C.J., Tannahill, L.A., Boelaert, K., Gittoes, N.J., Visser, T.J., Franklyn, J.A., Kilby, M.D., 2002. Early expression of thyroid hormone deiodinases and receptors in human fetal cerebral cortex. *Brain Res Dev Brain Res.* 138, 109-16.
- Danielson, P.E., Forss-Petter, S., Brow, M.A., Calavetta, L., Douglass, J., Milner, R.J., Sutcliffe, J.G., 1988. p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA.* 7, 261-7.
- Dasgupta, A., Das, S., Sarkar, P.K., 2005. Thyroid hormone stimulates gamma-glutamyl transpeptidase in the developing rat cerebra and in astroglial cultures. *J Neurosci Res.* 82, 851-7.
- Davis, P.J., Shih, A., Lin, H.Y., Martino, L.J., Davis, F.B., 2000. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J Biol Chem.* 275, 38032-9.
- Davis, P.J., Davis, F.B., Cody, V., 2005. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 419-435.
- Davis, P.J., Leonard, J.L., Davis, F.B., 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.* 29, 211-8.
- Davis, P.J., Davis, F.B., Lin, H.Y., Mousa, S.A., Zhou, M., Luidens, M.K., 2009. Translational implications of nongenomic actions of thyroid hormone initiated at its integrin receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297, E1238-46.



- Decherf, S., Seugnet, I., Kouidhi, S., Lopez-Juarez, A., Clerget-Froidevaux, M.S., Demeneix, B.A., 2010. Thyroid hormone exerts negative feedback on hypothalamic type 4 melanocortin receptor expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 4471-6.
- Dong, J., Yin, H., Liu, W., Wang, P., Jiang, Y., Chen, J., 2005. Congenital iodine deficiency and hypothyroidism impair LTP and decrease C-fos and C-jun expression in rat hippocampus. *Neurotoxicology.* 26, 417-26.
- Dupre, S.M., Guissouma, H., Flamant, F., Seugnet, I., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Samarut, J., Demeneix, B.A., Becker, N., 2004. Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 145, 2337-45.
- Farwell, A.P., Dubord-Tomasetti, S.A., Pietrzykowski, A.Z., Stachelek, S.J., Leonard, J.L., 2005. Regulation of cerebellar neuronal migration and neurite outgrowth by thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine. *Brain Res Dev Brain Res.* 154, 121-35.
- Ferreira, A., Busciglio, J., Caceres, A., 1989. Microtubule formation and neurite growth in cerebellar macroneurons which develop in vitro: evidence for the involvement of the microtubule-associated proteins, MAP-1a, HMW-MAP2 and Tau. *Brain Res Dev Brain Res.* 49, 215-28.
- Friedrichsen, S., Christ, S., Heuer, H., Schafer, M.K., Mansouri, A., Bauer, K., Visser, T.J., 2003. Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax8-/- mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology.* 144, 777-84.
- Gahr, M., 2004. Hormone-dependent neural plasticity in the juvenile and adult song system: what makes a successful male? *Ann N Y Acad Sci.* 1016, 684-703.
- Galton, V.A., Wood, E.T., St Germain, E.A., Withrow, C.A., Aldrich, G., St Germain, G.M., Clark, A.S., St Germain, D.L., 2007. Thyroid hormone homeostasis and action in the type 2 deiodinase-deficient rodent brain during development. *Endocrinology.* 148, 3080-8.
- Garza, R., Puymirat, J., Dussault, J.H., 1990. Influence of soluble environmental factors on the development of fetal brain acetylcholinesterase-positive neurons cultured in a chemically defined medium: comparison with the effects of L-triiodothyronine (L-T3). *Brain Res Dev Brain Res.* 56, 160-8.
- Giannakopoulos, P., Silhol, S., Jallageas, V., Mallet, J., Bons, N., Bouras, C., Delaere, P., 1997. Quantitative analysis of tau protein-immunoreactive accumulations and beta amyloid protein deposits in the cerebral cortex of the mouse lemur, *Microcebus murinus*. *Acta Neuropathol.* 94, 131-9.
- Gilbert, M.E., Sui, L., 2006. Dose-dependent reductions in spatial learning and synaptic function in the dentate gyrus of adult rats following developmental thyroid hormone insufficiency. *Brain Res.* 1069, 10-22.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121-41.
- Goodman, J.H., Gilbert, M.E., 2007. Modest thyroid hormone insufficiency during development induces a cellular malformation in the corpus callosum: a model of cortical dysplasia. *Endocrinology.* 148, 2593-7.
- Gothé, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J.M., Barros, A.C., Ohlsson, C., Vennstrom, B., Forrest, D., 1999. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes Dev.* 13, 1329-41.
- Gruters, A., 2007. Thyroid hormone transporter defects. *Endocr Dev.* 10, 118-26.
- Guadano-Ferraz, A., Benavides-Piccione, R., Venero, C., Lancha, C., Vennstrom, B., Sandi, C., DeFelipe, J., Bernal, J., 2003. Lack of thyroid hormone receptor alpha1 is associated with selective alterations in behavior and hippocampal circuits. *Mol Psychiatry.* 8, 30-8.



- Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Perez-Martinez, L., 2001. BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci.* 14, 483-94.
- Hashimoto, K., Curty, F.H., Borges, P.P., Lee, C.E., Abel, E.D., Elmquist, J.K., Cohen, R.N., Wondisford, F.E., 2001. An unliganded thyroid hormone receptor causes severe neurological dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 3998-4003.
- Hernandez, A., Martinez, M.E., Fiering, S., Galton, V.A., St Germain, D., 2006. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest.* 116, 476-84.
- Heuer, H., Mason, C.A., 2003. Thyroid hormone induces cerebellar Purkinje cell dendritic development via the thyroid hormone receptor alpha1. *J Neurosci.* 23, 10604-12.
- Heuer, H., Maier, M.K., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E.C., Visser, T.J., Bauer, K., 2005. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology.* 146, 1701-6.
- Heuer, H., 2007. The importance of thyroid hormone transporters for brain development and function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21, 265-76.
- Hong, S.H., Wong, C.W., Privalsky, M.L., 1998. Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) corepressor. *Mol Endocrinol.* 12, 1161-71.
- Huang, C.B., Chen, F.S., Chung, M.Y., 2002. Transient hypothyroxinemia of prematurity is associated with abnormal cranial ultrasound and illness severity. *Am J Perinatol.* 19, 139-47.
- Ishaik, G., Asztalos, E., Perlman, K., Newton, S., Frisk, V., Rovet, J., 2000. Hypothyroxinemia of prematurity and infant neurodevelopment: a pilot study. *J Dev Behav Pediatr.* 21, 172-9.
- Ishii, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, T., Hashimoto, K., Shibusawa, N., Onigata, K., Morikawa, A., Mori, M., 2004. Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol.* 18, 1708-20.
- Itoh, Y., Esaki, T., Kaneshige, M., Suzuki, H., Cook, M., Sokoloff, L., Cheng, S.Y., Nunez, J., 2001. Brain glucose utilization in mice with a targeted mutation in the thyroid hormone alpha or beta receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 9913-8.
- Jingami, H., Mizuno, N., Takahashi, H., Shibahara, S., Furutani, Y., Imura, H., Numa, S., 1985. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat corticotropin-releasing factor precursor. *FEBS Lett.* 191, 63-6.
- Joseph-Bravo, P., Perez-Martinez, L., Lezama, L., Morales-Chapa, C., Charli, J.L., 2002. An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Brain Res Protoc.* 9, 93-104.
- Kalb, R.G., Hockfield, S., 1992. Activity-dependent development of spinal cord motor neurons. *Brain Res Brain Res Rev.* 17, 283-9.
- Kaneshige, M., Kaneshige, K., Zhu, X., Dace, A., Garrett, L., Carter, T.A., Kazlauskaitė, R., Pankratz, D.G., Wynshaw-Boris, A., Refetoff, S., Weintraub, B., Willingham, M.C., Barlow, C., Cheng, S., 2000. Mice with a targeted mutation in the thyroid hormone beta receptor gene exhibit impaired growth and resistance to thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 13209-14.
- Karolyi, I.J., Dootz, G.A., Halsey, K., Beyer, L., Probst, F.J., Johnson, K.R., Parlow, A.F., Raphael, Y., Dolan, D.F., Camper, S.A., 2007. Dietary thyroid hormone replacement ameliorates hearing deficits in hypothyroid mice. *Mamm Genome.* 18, 596-608.
- Kilby, M.D., Gittoes, N., McCabe, C., Verhaeg, J., Franklyn, J.A., 2000. Expression of thyroid receptor isoforms in the human fetal central nervous system and the effects of intrauterine growth restriction. *Clin Endocrinol (Oxf).* 53, 469-77.



- Kimura-Kuroda, J., Nagata, I., Kuroda, Y., 2005. Hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit thyroid-hormone-dependent extension of cerebellar Purkinje cell dendrites. *Brain Res Dev Brain Res.* 154, 259-63.
- Kobayashi, K., Tsuji, R., Yoshioka, T., Kushida, M., Yabushita, S., Sasaki, M., Mino, T., Seki, T., 2005. Effects of hypothyroidism induced by perinatal exposure to PTU on rat behavior and synaptic gene expression. *Toxicology.* 212, 135-47.
- Koenig, R.J., Warne, R.L., Brent, G.A., Harney, J.W., Larsen, P.R., Moore, D.D., 1988. Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85, 5031-5.
- Kohrle, J., 2007. Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21, 173-91.
- Koibuchi, N., Chin, W.W., 2000. Thyroid hormone action and brain development. *Trends Endocrinol Metab.* 11, 123-8.
- Koibuchi, N., Jingu, H., Iwasaki, T., Chin, W.W., 2003. Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. *Cerebellum.* 2, 279-89.
- Koibuchi, N., Iwasaki, T., 2006. Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocr J.* 53, 295-303.
- Koller, K.J., Wolff, R.S., Warden, M.K., Zoeller, R.T., 1987. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 7329-33.
- Kumar, A., Sinha, R.A., Tiwari, M., Pal, L., Shrivastava, A., Singh, R., Kumar, K., Kumar Gupta, S., Godbole, M.M., 2006. Increased pro-nerve growth factor and p75 neurotrophin receptor levels in developing hypothyroid rat cerebral cortex are associated with enhanced apoptosis. *Endocrinology.* 147, 4893-903.
- Langlois, M.F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J.D., Hollenberg, A.N., Wondisford, F.E., 1997. A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem.* 272, 24927-33.
- Leader, J.E., Wang, C., Fu, M., Pestell, R.G., 2006. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. *Biochem Pharmacol.* 72, 1589-96.
- 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, 159-61.
- Lechan, R.M., Fekete, C., 2005. Role of thyroid hormone deiodination in the hypothalamus. *Thyroid.* 15, 883-97.
- Legrand, J., 1979. Morphogenetic actions of thyroid hormones. *Trends in Neurosciences.* 234-236.
- Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prevot, O., Samarut, J., Levi, G., Demeneix, B.A., 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J.* 19, 863-5.
- Louides, C., Faivre-Bauman, A., Puymirat, J., Tixier-Vidal, A., 1983. Effect of hormones on the development of mouse fetal hypothalamic neurons in vitro. *Monogr Neural Sci.* 9, 43-9.
- Macchia, P.E., Takeuchi, Y., Kawai, T., Cua, K., Gauthier, K., Chassande, O., Seo, H., Hayashi, Y., Samarut, J., Murata, Y., Weiss, R.E., Refetoff, S., 2001. Increased sensitivity to thyroid hormone in mice with complete deficiency of thyroid hormone receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 349-54.
- Mader, M.M., Cameron, D.A., 2006. Effects of induced systemic hypothyroidism upon the retina: regulation of thyroid hormone receptor alpha and photoreceptor production. *Mol Vis.* 12, 915-30.
- Manzano, J., Bernal, J., Morte, B., 2007. Influence of thyroid hormones on maturation of rat cerebellar astrocytes. *Int J Dev Neurosci.* 25, 171-9.



- Markakis, E.A., Swanson, L.W., 1997. Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev.* 24, 255-91.
- Markakis, E.A., 2002. Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 23, 257-291.
- Markakis, E.A., Palmer, T.D., Randolph-Moore, L., Rakic, P., Gage, F.H., 2004. Novel neuronal phenotypes from neural progenitor cells. *J Neurosci.* 24, 2886-97.
- Martinez, R., Gomes, F.C., 2005. Proliferation of cerebellar neurons induced by astrocytes treated with thyroid hormone is mediated by a cooperation between cell contact and soluble factors and involves the epidermal growth factor-protein kinase a pathway. *J Neurosci Res.* 80, 341-9.
- McNay, D.E., Pelling, M., Claxton, S., Guillemot, F., Ang, S.L., 2006. Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Mol Endocrinol.* 20, 1623-32.
- Michaud, J.L., Rosenquist, T., May, N.R., Fan, C.M., 1998. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* 12, 3264-75.
- Mitsuhashi, T., Tennyson, G., Nikodem, V., 1988. Nucleotide sequence of novel cDNAs generated by alternative splicing of a rat thyroid hormone receptor gene transcript. *Nucleic Acids Res.* 16, 5697.
- Moeller, L.C., Haselhorst, N.E., Dumitrescu, A.M., Cao, X., Seo, H., Refetoff, S., Mann, K., Janssen, O.E., 2010. Stanniocalcin 1 Induction by Thyroid Hormone Depends on Thyroid Hormone Receptor beta and Phosphatidylinositol 3-kinase Activation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* DOI: 10.1055/s-0030-1262860.
- Monden, T., Nakajima, Y., Hashida, T., Ishii, S., Tomaru, T., Shibusawa, N., Hashimoto, K., Satoh, T., Yamada, M., Mori, M., Kasai, K., 2006. Expression of thyroid hormone receptor isoforms down-regulated by thyroid hormone in human medulloblastoma cells. *Endocr J.* 53, 181-7.
- Moore, D.D., Brent, G.A., 1991. Thyroid hormone: half-sites and insights. *Molecular Approaches to the Study of Thyroid hormone Action: a Keystone Symposium*, Tamarron, CO, USA, March 8-14, 1991. *New Biol.* 3, 835-44.
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T., Vennstrom, B., Bernal, J., 2002. Deletion of the thyroid hormone receptor alpha 1 prevents the structural alterations of the cerebellum induced by hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 3985-9.
- Morte, B., Manzano, J., Scanlan, T.S., Vennstrom, B., Bernal, J., 2004. Aberrant maturation of astrocytes in thyroid hormone receptor alpha 1 knockout mice reveals an interplay between thyroid hormone receptor isoforms. *Endocrinology.* 145, 1386-91.
- Muller, Y., Rocchi, E., Lazaro, J.B., Clos, J., 1995. Thyroid hormone promotes BCL-2 expression and prevents apoptosis of early differentiating cerebellar granule neurons. *Int J Dev Neurosci.* 13, 871-85.
- Munoz, A., Rodriguez-Pena, A., Perez-Castillo, A., Ferreiro, B., Sutcliffe, J.G., Bernal, J., 1991. Effects of neonatal hypothyroidism on rat brain gene expression. *Mol Endocrinol.* 5, 273-80.
- Munoz, A., Wrighton, C., Seliger, B., Bernal, J., Beug, H., 1993. Thyroid hormone receptor/c-erbA: control of commitment and differentiation in the neuronal/chromaffin progenitor line PC12. *J Cell Biol.* 121, 423-38.
- Nery, S., Wichterle, H., Fishell, G., 2001. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Development.* 128, 527-40.
- Ng, L., Hurley, J.B., Dierks, B., Srinivas, M., Salto, C., Vennstrom, B., Reh, T.A., Forrest, D., 2001. A thyroid hormone receptor that is required for the development of green cone photoreceptors. *Nat Genet.* 27, 94-8.



- Nikrodhanond, A.A., Ortiga-Carvalho, T.M., Shibusawa, N., Hashimoto, K., Liao, X.H., Refetoff, S., Yamada, M., Mori, M., Wondisford, F.E., 2006. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem.* 281, 5000-7.
- Niquet, J., Perez-Martinez, L., Guerra, M., Grouselle, D., Joseph-Bravo, P., Charli, J., 2000. Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res Dev Brain Res.* 120, 49-56.
- Nunez, E., Kwon, Y.S., Hutt, K.R., Hu, Q., Cardamone, M.D., Ohgi, K.A., Garcia-Bassets, I., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., Fu, X.D., 2008. Nuclear receptor-enhanced transcription requires motor- and LSD1-dependent gene networking in interchromatin granules. *Cell.* 132, 996-1010.
- Nunez, J., Couchie, D., Aniello, F., Bridoux, A.M., 1991. Regulation by thyroid hormone of microtubule assembly and neuronal differentiation. *Neurochem Res.* 16, 975-82.
- Nunez, J., Couchie, D., Aniello, F., Bridoux, A.M., 1992. Thyroid hormone effects on neuronal differentiation during brain development. *Acta Med Austriaca.* 19 Suppl 1, 36-9.
- Obregon, M.J., Mallol, J., Pastor, R., Morreale de Escobar, G., Escobar del Rey, F., 1984. L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology.* 114, 305-7.
- Oppenheimer, J.H., Samuels, H.H., Apriletti, J.W., 1983. Molecular basis of thyroid hormone action, Vol., Academic Press, New York.
- Osborn, D.A., 2000. Thyroid hormone for preventing of neurodevelopmental impairment in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev.* CD001070.
- Perez-Martinez, L., Carreon-Rodriguez, A., Gonzalez-Alzati, M.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.
- Perez-Martinez, L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2001. Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Dev Brain Res.* 130, 73-81.
- Perez-Martinez, L., Jaworski, D.M., 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci.* 25, 4917-29.
- Pérez-Martínez, L., Charli, J.-L., 2006. Factors involved in the establishment of hypothalamic neuroendocrine phenotypes. In: *Molecular Endocrinology.* Vol., P. Joseph-Bravo, ed. ^eds. Research Signpost.
- Pinazo-Duran, M.D., Iborra, F.J., Pons, S., Sevilla-Romero, E., Gallego-Pinazo, R., Munoz, A., 2005. Postnatal thyroid hormone supplementation rescues developmental abnormalities induced by congenital-neonatal hypothyroidism in the rat retina. *Ophthalmic Res.* 37, 225-34.
- Porterfield, S.P., Hendrich, C.E., 1992. Tissue iodothyronine levels in fetuses of control and hypothyroid rats at 13 and 16 days gestation. *Endocrinology.* 131, 195-200.
- Puymirat, J., Barret, A., Picart, R., Vigny, A., Loudes, C., Faivre-Bauman, A., Tixier-Vidal, A., 1983. Triiodothyronine enhances the morphological maturation of dopaminergic neurons from fetal mouse hypothalamus cultured in serum-free medium. *Neuroscience.* 10, 801-10.
- Qiu, P., Feng, X.H., Li, L., 2003. Interaction of Smad3 and SRF-associated complex mediates TGF-beta1 signals to regulate SM22 transcription during myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol.* 35, 1407-20.
- Ramos, H.E., Weiss, R.E., 2006. Regulation of nuclear coactivator and corepressor expression in mouse cerebellum by thyroid hormone. *Thyroid.* 16, 211-6.
- Reinehr, T., Isa, A., de Sousa, G., Dieffenbach, R., Andler, W., 2008. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm Res.* 70, 51-7.



- Roberts, M.R., Srinivas, M., Forrest, D., Morreale de Escobar, G., Reh, T.A., 2006. Making the gradient: thyroid hormone regulates cone opsin expression in the developing mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 6218-23.
- Roegge, C.S., Morris, J.R., Villareal, S., Wang, V.C., Powers, B.E., Klintsova, A.Y., Greenough, W.T., Pessah, I.N., Schantz, S.L., 2006. Purkinje cell and cerebellar effects following developmental exposure to PCBs and/or MeHg. *Neurotoxicol Teratol.* 28, 74-85.
- Rohr, K.B., Barth, K.A., Varga, Z.M., Wilson, S.W., 2001. The nodal pathway acts upstream of hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron.* 29, 341-51.
- Santalucia, T., Palacin, M., Zorzano, A., 2006. T3 strongly regulates GLUT1 and GLUT3 mRNA in cerebral cortex of hypothyroid rat neonates. *Mol Cell Endocrinol.* 251, 9-16.
- Santisteban, P., Bernal, J., 2005. Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev Endocr Metab Disord.* 6, 217-28.
- Scott, R.E., Wu-Peng, X.S., Yen, P.M., Chin, W.W., Pfaff, D.W., 1997. Interactions of estrogen- and thyroid hormone receptors on a progesterone receptor estrogen response element (ERE) sequence: a comparison with the vitellogenin A2 consensus ERE. *Mol Endocrinol.* 11, 1581-92.
- Schwartz, C.E., Stevenson, R.E., 2007. The MCT8 thyroid hormone transporter and Allan-Herndon-Dudley syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 21, 307-21.
- Segerson, T.P., Kauer, J., Wolfe, H.C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I.M., Lechan, R.M., 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 238, 78-80.
- Sendin, G., Bulankina, A.V., Riedel, D., Moser, T., 2007. Maturation of ribbon synapses in hair cells is driven by thyroid hormone. *J Neurosci.* 27, 3163-73.
- Shibusawa, N., Yamada, M., Hirato, J., Monden, T., Satoh, T., Mori, M., 2000. Requirement of thyrotropin-releasing hormone for the postnatal functions of pituitary thyrotrophs: ontogeny study of congenital tertiary hypothyroidism in mice. *Mol Endocrinol.* 14, 137-46.
- Siesser, W.B., Cheng, S.Y., McDonald, M.P., 2005. Hyperactivity, impaired learning on a vigilance task, and a differential response to methylphenidate in the TRbetaPV knock-in mouse. *Psychopharmacology (Berl).* 181, 653-63.
- Siesser, W.B., Zhao, J., Miller, L.R., Cheng, S.Y., McDonald, M.P., 2006. Transgenic mice expressing a human mutant beta1 thyroid receptor are hyperactive, impulsive, and inattentive. *Genes Brain Behav.* 5, 282-97.
- Singh, R., Upadhyay, G., Kumar, S., Kapoor, A., Kumar, A., Tiwari, M., Godbole, M.M., 2003. Hypothyroidism alters the expression of Bcl-2 family genes to induce enhanced apoptosis in the developing cerebellum. *J Endocrinol.* 176, 39-46.
- Storey, E., Cappai, R., 1999. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 25, 81-97.
- Suen, C.H., Yen, P.M., Chin, W.W., 1994. *In Vitro* Transcriptional Studies of the Roles of the Thyroid Hormone (T₃) Response Elements and Minimal Promoters in T₃-stimulated Gene Transcription. *The Journal of Biological Chemistry.* 269, 1314-1322.
- Suzuki, S., Miyamoto, T., Opsahl, A., Sakurai, A., DeGroot, L.J., 1994. Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. *Mol Endocrinol.* 8, 305-14.
- Tang, H.Y., Lin, H.Y., Zhang, S., Davis, F.B., Davis, P.J., 2004. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology.* 145, 3265-72.
- Taylor, T., Gyves, P., Burgunder, J.M., 1990a. Thyroid hormone regulation of TRH mRNA levels in rat paraventricular nucleus of the hypothalamus changes during ontogeny. *Neuroendocrinology.* 52, 262-7.



- Taylor, T., Wondisford, F.E., Blaine, T., Weintraub, B.D., 1990b. The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology*. 126, 317-24.
- Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R., Evans, R.M., 1987. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science*. 237, 1610-4.
- Ubieta, R., Uribe, R.M., Gonzalez, J.A., Garcia-Vazquez, A., Perez-Monter, C., Perez-Martinez, L., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., 2007. BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway. *Brain Res*. 1174, 28-38.
- Uchida, K., Yonezawa, M., Nakamura, S., Kobayashi, T., Machida, T., 2005. Impaired neurogenesis in the growth-retarded mouse is reversed by T3 treatment. *Neuroreport*. 16, 103-6.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., Evans, R.M., 1991. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*. 65, 1255-66.
- Vasudevan, N., Davidkova, G., Zhu, Y.S., Koibuchi, N., Chin, W.W., Pfaff, D., 2001a. Differential interaction of estrogen receptor and thyroid hormone receptor isoforms on the rat oxytocin receptor promoter leads to differences in transcriptional regulation. *Neuroendocrinology*. 74, 309-24.
- Vasudevan, N., Koibuchi, N., Chin, W.W., Pfaff, D.W., 2001b. Differential crosstalk between estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta and the thyroid hormone receptor isoforms results in flexible regulation of the consensus ERE. *Brain Res Mol Brain Res*. 95, 9-17.
- Vasudevan, N., Zhu, Y.S., Daniel, S., Koibuchi, N., Chin, W.W., Pfaff, D., 2001c. Crosstalk between oestrogen receptors and thyroid hormone receptor isoforms results in differential regulation of the preproenkephalin gene. *J Neuroendocrinol*. 13, 779-90.
- Vasudevan, N., Kia, H.K., Inoue, S., Muramatsu, M., Pfaff, D., 2002. Isoform specificity for oestrogen receptor and thyroid hormone receptor genes and their interactions on the NR2D gene promoter. *J Neuroendocrinol*. 14, 836-42.
- Venero, C., Guadano-Ferraz, A., Herrero, A.I., Nordstrom, K., Manzano, J., de Escobar, G.M., Bernal, J., Vennstrom, B., 2005. Anxiety, memory impairment, and locomotor dysfunction caused by a mutant thyroid hormone receptor alpha1 can be ameliorated by T3 treatment. *Genes Dev*. 19, 2152-63.
- Vermiglio, F., Lo Presti, V.P., Moleti, M., Sidoti, M., Tortorella, G., Scaffidi, G., Castagna, M.G., Mattina, F., Violi, M.A., Crisa, A., Artemisia, A., Trimarchi, F., 2004. Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency: a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries. *J Clin Endocrinol Metab*. 89, 6054-60.
- Wataya, T., Ando, S., Muguruma, K., Ikeda, H., Watanabe, K., Eiraku, M., Kawada, M., Takahashi, J., Hashimoto, N., Sasai, Y., 2008. Minimization of exogenous signals in ES cell culture induces rostral hypothalamic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105, 11796-801.
- Winter, H., Braig, C., Zimmermann, U., Geisler, H.S., Franzer, J.T., Weber, T., Ley, M., Engel, J., Knirsch, M., Bauer, K., Christ, S., Walsh, E.J., McGee, J., Kopschall, I., Rohbock, K., Knipper, M., 2006. Thyroid hormone receptors TRalpha1 and TRbeta differentially regulate gene expression of Kcnq4 and prestin during final differentiation of outer hair cells. *J Cell Sci*. 119, 2975-84.
- Yanagi, Y., Takezawa, S., Kato, S., 2002. Distinct functions of photoreceptor cell-specific nuclear receptor, thyroid hormone receptor beta2 and CRX in one photoreceptor development. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 43, 3489-94.



- Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 81, 1097-142.
- Zhang, J., Lazar, M.A., 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol.* 62, 439-66.
- Zhao, X., Lorenc, H., Stephenson, H., Wang, Y.J., Witherspoon, D., Katzenellenbogen, B., Pfaff, D., Vasudevan, N., 2005. Thyroid hormone can increase estrogen-mediated transcription from a consensus estrogen response element in neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 4890-5.
- Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris, C., 2005. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology.* 146, 607-12.



ANEXOS

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres**BRAIN
RESEARCH****Research Report****T3 differentially regulates TRH expression in developing hypothalamic neurons in vitro****Alfonso Carreón-Rodríguez, Jean-Louis Charli, Leonor Pérez-Martínez***

Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM, A.P. 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 11 September 2009

Available online 18 September 2009

Keywords:

Development

Neuronal differentiation

TRH

Hypothalamus

Gene expression

ABSTRACT

Triiodothyronine (T3) plays an important role during development of the central nervous system. T3 effects on gene expression are determined in part by the type of thyroid hormone receptors (TRs) expressed in a given cell type. Previous studies have demonstrated that thyrotropin releasing hormone (TRH) transcription in the adult hypothalamus is subjected to negative regulation by thyroid hormones. However, the role of T3 on the development of TRH expression is unknown. In this study we used primary cultures derived from 17-day-old fetal rat hypothalamus to analyze the effects of T3 on TRH gene expression during development. T3 increased TRH mRNA expression in immature cultures, but decreased it in mature cultures. In addition, T3 up-regulated TR α 1 and TR β 2 mRNA expression. TR α 1 expression coincided chronologically with that of TRH in the rat hypothalamus in vivo. Maturation of TRH expression in the hypothalamus may involve T3 acting through TR α 1.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Thyroid hormones (TH) are secreted mostly as thyroxine (T4) from the thyroid gland and converted in diverse tissues to the transcriptionally active form 3,5,3'-triiodothyronine (T3), by the deiodinases type 1 and 2 (D1, D2) (Yen, 2001). T3 plays a key role during central nervous system (CNS) development. Deficiency during the fetal and early postnatal period leads to striking abnormalities in dendritic and axonal growth, synaptogenesis, neuronal migration, myelination as well as neuronal cell death (Chan and Kilby, 2000). T3 treatment immediately after birth is sufficient to prevent most of the brain damage induced by neonatal hypothyroidism; such treatment however cannot fully rescue abnormal brain development induced by hypothyroidism in utero (i.e., by maternal iodine deficiency) (Koibuchi and Iwasaki, 2006). Thus, T3 must act within a critical developmental window beyond which hormone replacement cannot recover normal

function, as observed for cerebellum (Koibuchi et al., 2003) or cochlea (Karolyi et al., 2007) development.

During neurodevelopment, activation and repression of specific genes are critical to complete the neuronal differentiation program. T3 mediates positive and negative gene expression through nuclear TRs. Two TRs (α and β) have been identified; they give rise to different splice variants. The TR α gene encodes five protein products (TR α 1, TR α 2, TR α 3, and the truncated products Δ TR α 1 and Δ TR α 2) of which only TR α 1 binds T3. The TR β gene encodes four products (TR β 1, TR β 2, TR β 3 and truncated Δ TR β 3) that bind T3, but the truncated isoform does not bind DNA. There is no clear physiological role for the non-receptor proteins (Zhang and Lazar, 2000, Santisteban and Bernal, 2005). However, some non-genomic actions of thyroid hormones have been attributed to the truncated TR isoforms and also to the plasma membrane receptor, integrin α v β 3 (Davis et al., 2008).

* Corresponding author. Fax: +52 777 3291622.

E-mail address: leonor@ibt.unam.mx (L. Pérez-Martínez).

TRs can either enhance or repress transcription by binding to thyroid hormone response elements (TREs) present on target gene promoters. The bimodal regulatory properties of TRs are regulated by protein–protein interactions as homo- or hetero-dimers in association with retinoid, estrogen or other nuclear receptors, or with basal transcription factors, transcriptional corepressor/coactivator proteins, as well as with chromatin-remodeling protein complexes (Glass and Rosenfeld, 2000, Ishii et al., 2004). Furthermore, T3 effects may be also attributable to its ability to regulate TRs expression (Lezoualc'h et al., 1994). Accordingly, the rat TR β 1 expression is up-regulated by T3 in the lacrimal gland and ocular surface (Dias et al., 2007). Two TREs on the human TR β 1 promoter region have been identified, which are able to bind both TR α 1 and TR β 1 in a T3 dependent manner (Sakurai et al., 1992, Suzuki et al., 1994).

During murine development, TR α 1 mRNA has been detected from E11.5 in the neural tube and later on in all brain areas whereas TR β mRNA variants are restricted to the diencephalon and mesencephalon from E12.5 (Bradley et al., 1992). In terms of neurodevelopmental actions, the TR β and TR α 1 are crucial for cochlear and TR β 2 for retinal cone photoreceptors development (Forrest et al., 2002); these data suggest that the TR repertoire expressed in a given brain area and cell type contributes to determine T3 action.

The hypothalamus is an integrator of homeostatic processes required for survival of vertebrates. Disruption of the hypothalamus development thus has the potential of altering important physiological processes with lifelong consequences. The hypothalamus mediates homeostasis in part by regulating hormone secretion from the pituitary gland. Discrete populations of secretory neurons mediate this function. Among these neurons are the TRH producing neurons of the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus.

TRH released from the hypothalamic median eminence coordinates hypothalamus–pituitary–thyroid (HPT) axis function by controlling the release of thyrotropin (TSH) from the pituitary, leading to thyroid hormone synthesis and release from the thyroid gland. Serum thyroid hormone levels are regulated by T3 negative feedback on TRH and TSH biosynthesis. Even though serum thyroid hormones are detectable during the fetal stage and well accumulated into brain and liver (Obregon et al., 1984; Porterfield and Hendrich, 1992), T3 negative feedback on PVN TRH expression is only established in rat after the 7th postnatal day (Taylor et al., 1990b).

Hypothalamic TRH expression is regulated during development in vivo (Burgunder and Taylor, 1989; Perez-Martinez et al., 2001). Studies in serum-free cultures of fetal hypothalamic cells have allowed the identification of instructive differentiating signals. Among these, T3 promotes TRH release by developing hypothalamic neurons in culture (Loudes et al., 1983). However, the role of T3 on the development of TRH mRNA expression is essentially unknown. We, therefore, studied the effects of T3 on TRH gene expression during development using primary cultures derived from E17 rat hypothalamus. T3 increased the expression of TRH mRNA during the terminal phase of the differentiation program, before the establishment of the negative feedback. In addition, T3 treatment up-regulated TR α 1 and TR β 2 mRNA expression.

In vivo expression of TR α 1 (Thompson et al., 1987) coincided chronologically with that of TRH and preceded that of TR β 2 in the rat hypothalamus. Computer analysis of the TR β 2 promoter revealed the presence of a putative TRE conserved among mammals. Therefore, up-regulation of TR α 1 and TR β 2 by T3 might contribute to maturation of TRH expression, and consequently to the establishment of the negative feedback in the hypothalamus.

2. Results

As an initial approach to explore the involvement of T3 during TRH phenotype differentiation, primary cultures derived from E17 rat hypothalamus were prepared; they were kept in presence of serum to facilitate the apparition of a mature neuronal phenotype. After 6, 12 or 18 DIV, cultures were treated with T3, harvested and processed for RT-PCR assays to determine TRH expression. T3 regulated TRH expression; the effect differed according to the degree of maturity of the culture. At 6 DIV, T3 treatment (10^{-9} – 10^{-6} M) did not regulate TRH mRNA expression (Fig. 1A, 6 DIV, left and right panel). On the other hand, within 1 h treatment T3 increased TRH expression at 12 DIV. This effect was observed at 10^{-9} M, a concentration equal to T3 serum levels in adult mice (Friedrichsen et al., 2003), 10^{-8} and 10^{-6} M (Fig. 1A, 12 DIV, left panel) ($P < 0.0001$). To determine the temporal response of T3-induced TRH mRNA expression, 12 DIV cultures were treated with 10^{-8} M T3 and harvested at different time-points. The stimulatory effect was only observed after 1-h treatment; longer treatments resulted in an inhibitory effect (Fig. 1A, 12 DIV, right panel) ($P < 0.0001$).

To further determine whether regulation of TRH mRNA expression by T3 depends on the maturation degree of the culture (Fig. 1B), cells maintained for 18 DIV were treated with different doses of T3 for 1 h. Unlike at 12 DIV, TRH mRNA expression was significantly inhibited in response to T3 treatment (10^{-9} – 10^{-6} M) at 18 DIV (Fig. 1A, 18 DIV, left panel) ($P < 0.0001$). An additional decrease (to 38 ± 1.9 % of control values) was observed with longer periods (12 h) of 10^{-8} M T3 treatment (Fig. 1A, 18 DIV, right panel) ($P < 0.0001$).

Because one of the major mechanisms of gene expression regulation by T3 is through TRs action, we next investigated the expression pattern of four of the TRs in primary hypothalamic culture. TR α 1, TR α 2, TR β 1 and TR β 2 transcripts were present at the 3 time points assayed (8, 12 and 18 DIV). At 8 DIV, all isoforms studied were present; thereafter, TR α 1, TR α 2 and TR β 1 mRNA expression showed a tendency to increase at 12 DIV, after which (18 DIV) TR α 1, TR α 2 and to a lesser extent TR β 1 transcripts, decreased to initial levels (Fig. 2). In contrast, TR β 2 expression was significantly reduced as the culture proceeded, being expressed at 10 ± 6 % at 12 DIV and at 39 ± 5 % at 18 DIV when compared to 8 DIV (Fig. 2) ($P < 0.05$).

T3 regulates the expression of various TRs and co-modulators (Clerget-Froidevaux et al., 2004), and hence can also regulate indirectly gene expression. To test the ability of T3 to regulate TRs synthesis under our experimental conditions, 18 DIV cultures were subjected to 1 h of 10^{-8} M T3 treatment and the expression of the TR isoform transcripts

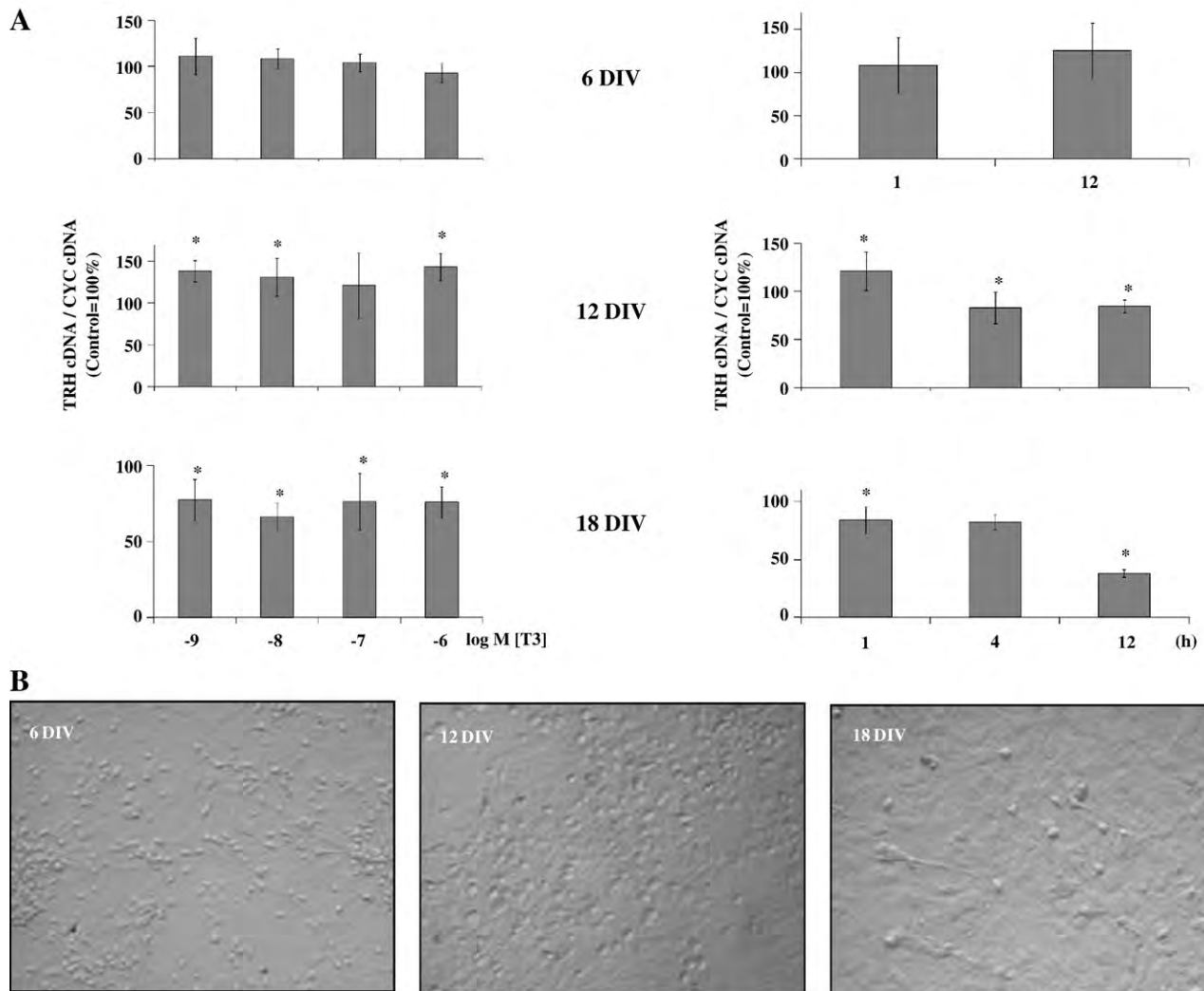


Fig. 1 – T3 regulated TRH mRNA expression according to the developmental stage of the hypothalamic cell culture. Cells were maintained in serum-supplemented medium. (A) Dose-responses (left). Fetal hypothalamic cells cultured for 6, 12 and 18 DIV (upper, middle and lower rows, respectively) were treated with various doses of T3 (10^{-9} to 10^{-6} M) for 1 h. Kinetics (right). TRH mRNA kinetic response to a 10^{-8} M T3 stimulus at 6, 12 and 18 DIV (upper, middle and lower rows, respectively). The relative TRH mRNA levels were determined by RT-PCR and calculated as the ratio of TRH cDNA signal/cyclophilin cDNA signal; values were expressed as percentage of control. Results of three independent experiments are shown, $n=4-7$. *: significant difference against control; $P<0.05$. (B) Photographs showing hypothalamic cell culture at 6, 12 and 18 DIV. Images were taken with an inverted microscope (Nikon) at $10\times$, with Hoffman illumination.

determined by RT-PCR assays. Even though the four TRs isoforms were expressed *in vitro*, only the TR α 1 and TR β 2 mRNA levels were significantly up regulated (1.4-fold, respectively) in response to T3 treatment (Fig. 3) ($P<0.05$).

Because most of our studies were conducted in the presence of serum and since growth factors (like FGF and EGF) are inhibitory signals for neuronal differentiation (Garza et al., 1990), we tested whether serum factors interfere with T3 action on TRH gene expression. Primary cultures were maintained in serum-free Neurobasal medium, which reduces glial proliferation but maintains hypothalamic neurons (Niquet et al., 2000; Guerra-Crespo et al., 2001), and incubated for different time periods before T3 treatment. The rapid (1 h) induction of TRH expression by T3 treatment on 12 DIV

cultures in the presence of serum (Fig. 1A) was delayed (detected at 4 h) in the absence of serum (Fig. 4, upper panel) ($P<0.05$). In addition, the inhibitory effect observed at 18 DIV in the presence of serum (Fig. 1A) was eliminated in the absence of serum (Fig. 4, lower panel). These data suggest that serum factors modulate T3 effects on TRH expression.

Since many biological effects of T3 are mediated by the TRs and previous studies have demonstrated that T3 promotes neuronal terminal differentiation in different brain areas (Chan and Kilby, 2000), we studied the expression of the TRs *in vivo* during the rat hypothalamus development. RT-PCR analysis revealed that the TR β 1 mRNA was expressed at low levels at the earliest development stages examined (E14–E18). Expression increased gradually, peaking at 2 months (804%

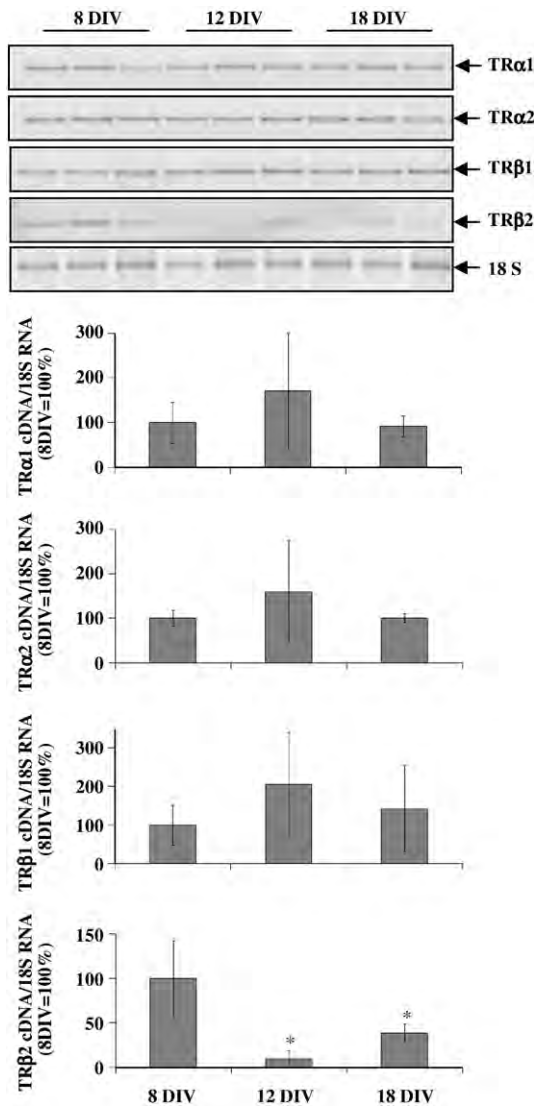


Fig. 2 – Thyroid hormone receptors transcripts were present in hypothalamic cells in culture but only the TRβ2 transcript was developmentally regulated. Cells were maintained in serum-supplemented medium. Levels of thyroid hormone receptors isoform α1, α2, β1 and β2 mRNAs were determined at 8, 12 and 18 DIV by RT-PCR, quantified by computer-assisted densitometry in arbitrary units and normalized against the 18S fraction of RNA as internal control. Values are represented as percentages with respect to internal control. 8 DIV, taken as 100%. Results of two independent experiments are shown, $n=3-5$. *: significant difference against 8 DIV; $P<0.05$.

compared to value at E14), and then decreased at 5 months of age (406%) (Fig. 5A). Similarly, the TRβ2 mRNA was expressed at very low levels at E14 and E16. A 22-fold increase (compared to E14) in TRβ2 mRNA level was then detected at E20. A further increase (35-fold compared to E14) was observed at P0 after which, TRβ2 mRNA was sustained at high levels until the adult stage (Fig. 5A). On the other hand, very low levels of TRα2 mRNA were detected at the earliest time point examined (E14). Expression increased at E16 (5.1-fold), remained stable until P0

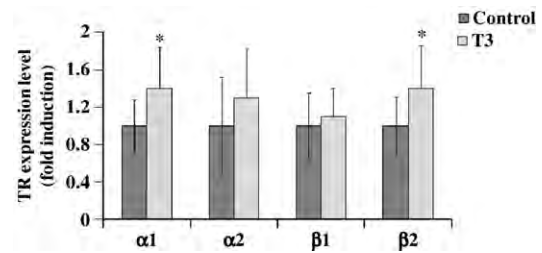


Fig. 3 – TRα1 and TRβ2 transcripts were up-regulated by T3 in primary cultures of hypothalamic cells. Cells were maintained in serum-supplemented medium. 18 DIV cell cultures were treated with 10^{-8} M T3 for 1 h and thyroid hormone receptor isoform mRNA levels were determined by RT-PCR assays. The amplified products were quantified by densitometry. Values were normalized to cyclophilin mRNA levels and expressed as fold induction. Results of three independent experiments are shown, $n=5-7$. *: significant difference against control; $P<0.05$.

and then decreased close to initial levels at 5 months of age (Fig. 5A). Finally, the TRα1 mRNA was detected at all time points examined. A slight increase was observed at early developmental stages (E16–E18) peaking at P0 (1.6-fold compared to E14); levels slightly diminished at 2–3 months of age. At 5 months of age TRα1 mRNA expression decreased to E14 levels (Fig. 5A). TRα1 protein levels were regulated similarly to mRNA levels (Fig. 5B). Expression gradually increased between

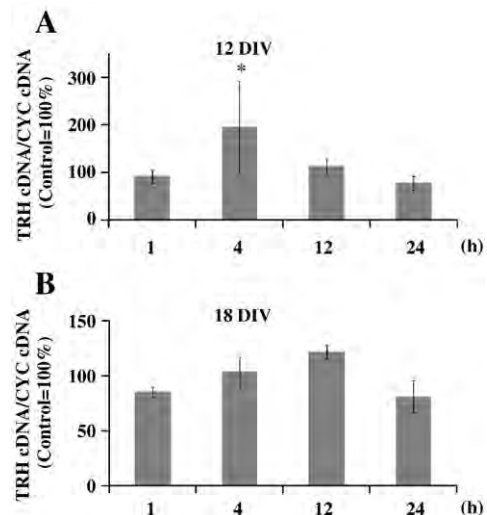
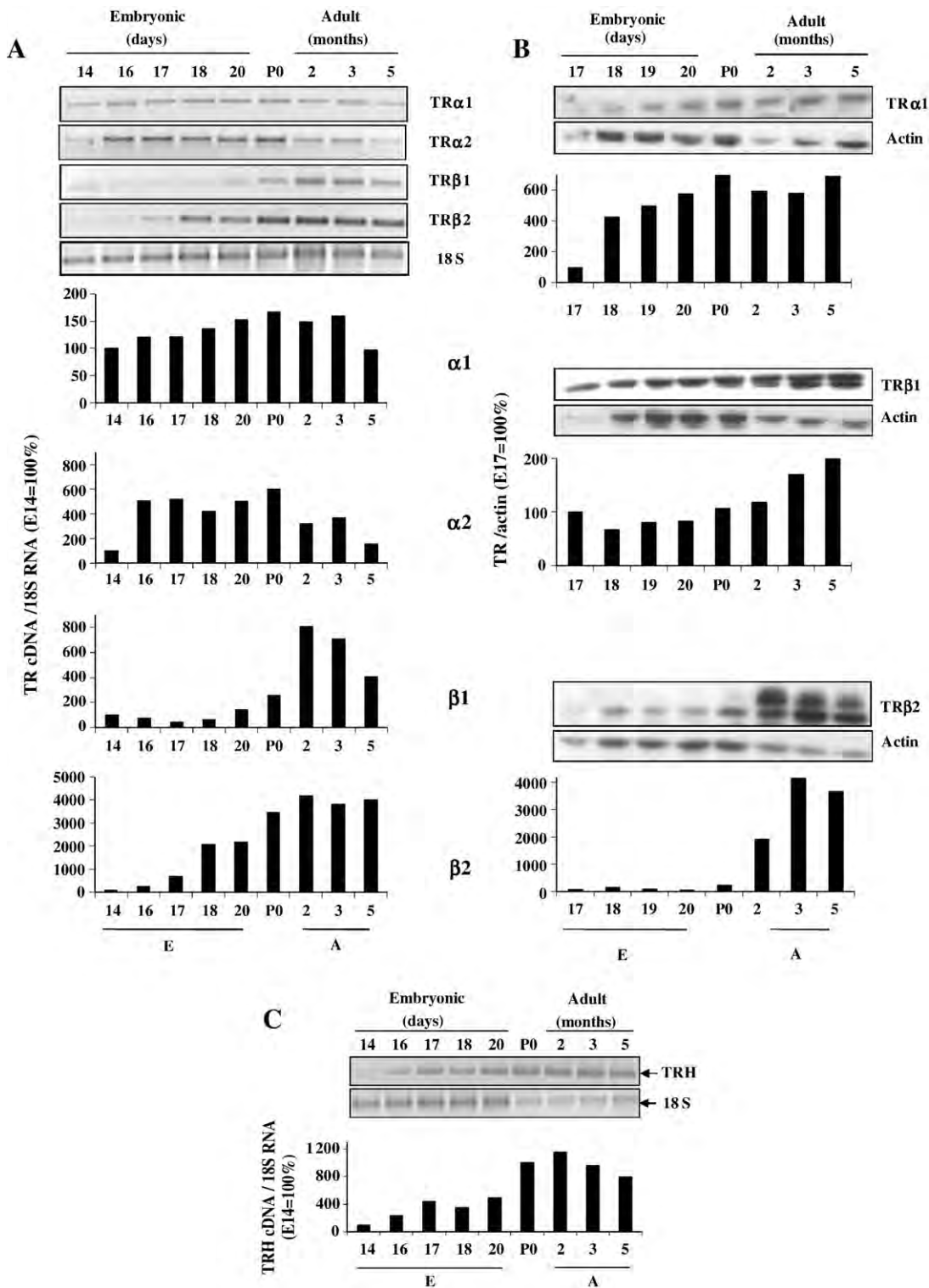


Fig. 4 – T3 regulated distinctly TRH mRNA levels in serum-free cultures of hypothalamic cells. Fetal hypothalamic cells cultured in serum-free medium were treated with 10^{-8} M T3 and harvested at 12 DIV (upper panel) and 18 DIV (lower panel) at the indicated time points. The relative TRH mRNA levels were determined by RT-PCR and calculated as the ratio of TRH cDNA signal/cyclophilin cDNA signal; values were expressed as percentage of control. Results of two independent experiments are shown, $n=3$. *: significant difference against control; $P<0.05$.

E18–E20, peaked at P0 (7.5-fold the value at E17) and then slightly decreased at 2 and 3 months of age (5.8-fold compared to E17). An additional increase (6.9-fold compared to E17) was observed at 5 months of age (Fig. 5B). TR β 2 protein levels were also regulated during development of the hypothalamus. Low levels of TR β 2 protein were detected early in development (E17–E19). However, a dramatic increase was observed from P0 (2.7-fold compared to E17) to 3 months of age (42-fold compared to E17). On the contrary, TR β 1 protein levels were

not regulated during development of the hypothalamus but a tendency to increase was observed at the adult stage (Fig. 5B).

An interesting observation is the fact that the expression of the mRNA that encodes for the TR α 1 isoform coincided chronologically with that of TRH in the rat hypothalamus. TRH mRNA expression initiates at E14 in the rat diencephalon (Burgunder and Taylor, 1989). In agreement with previous studies (Perez-Martinez et al., 2001), we observed that TRH expression was regulated during development of the



hypothalamus. TRH mRNA expression initiated on E14; it rose slowly during the following days peaking at 2 months of age; thereafter a slight decrease was observed (Fig. 5C).

Given the fact that TRH and corticotrophin releasing hormone (CRH) neurons are generated during partially overlapping periods of time (Baram and Lerner, 1991; Markakis, 2002), and thyroid hormone receptors are expressed within hypothalamus (this work), TRH and CRH neurons may share regulatory mechanisms during development, including a response to thyroid hormone. Therefore, we determined whether the effects of T3 were specific for TRH or could affect a broader neuropeptidergic spectrum. Cultures maintained in serum-supplemented medium were treated at 12 or 18 DIV with T3; CRH mRNA expression was evaluated at different time points. In contrast to the fact that TRH mRNA expression was significantly inhibited at 18 DIV (Fig. 3), the levels of CRH expression were significantly up-regulated in mature cultures (18 DIV) after 12 h of T3 treatment (Fig. 6) ($P < 0.05$). However, T3 treatment had no effect on CRH mRNA expression in less mature cultures (Fig. 6).

3. Discussion

The identity of the neurotransmitters that a neuron will synthesize and its target structures are determined during the terminal phase of the differentiation program. This process is regulated by extracellular signals leading to the induction of transcription factors and specific gene expression. Hormones are among the extracellular factors that induce the expression of a particular phenotype (Kalb and Hockfield, 1992; Gahr, 2004; Leader et al., 2006).

Within the neuroendocrine hypothalamus, the hypophyseotropic TRH neurons control the HPT axis. TRH transcription in the adult hypothalamic PVN is subjected to regulation by thyroid hormones (Segerson et al., 1987; Koller et al., 1987). In vivo, negative regulation by T3 is mediated by the TR β 2 isoform (Langlois et al., 1997; Ishii et al., 2004), but also by the TR β 1 isoform (Dupre et al., 2004). Despite the well-acknowledged importance of T3 for HPT axis regulation, it is unknown whether T3 plays a role in the development of hypothalamic TRH mRNA expression. So far, a single study has proposed that T3 promotes TRH release by developing hypothalamic neurons in culture (Loudes et al., 1983).

By taking advantage of the primary cultures derived from E17 rat hypothalamus, we focused on the effect of T3 on TRH gene expression during the terminal phase of neuronal differentiation. T3 regulated TRH mRNA expression. Interest-

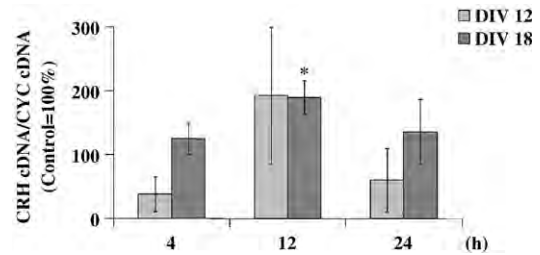


Fig. 6 – CRH mRNA responses to T3 in primary cultures of hypothalamic cells. Fetal hypothalamic cells maintained in serum-supplemented medium were treated with 10^{-8} M T3 and harvested at 12 or 18 DIV at the indicated time points. The relative CRH mRNA levels were determined by RT-PCR and quantified by computer-assisted densitometry in arbitrary units. Values were corrected against cyclophilin mRNA levels as internal control and expressed as percentage of control. Results of two independent experiments are shown, $n=3$. *: significant difference against control; $P < 0.05$.

ingly, the T3 mediated effects depended on the maturity of the hypothalamic culture. Immature cultures (12 DIV) showed an increase in TRH expression whereas an inhibitory effect was observed in mature cultures (18 DIV).

The T3-induced enhancement of TRH expression on immature cultures may be due to a classical genomic effect, either direct on the TRH promoter, or indirect. If this is the case, which is the TR isoform involved? Theoretically, both TR α 1 and TR β 2 receptors could participate, because both were expressed during the initiation period (E14–E16) of TRH mRNA expression in vivo. However, TR β 2 is expressed at lower levels between E14–E17 compared to later developmental stages (E18–adult). TR α 1, on the other hand, is expressed constantly at all developmental stages (E14–adult) in vivo.

TR α 1 is expressed widely in the brain from early embryonic stages and it is also the major TR isoform expressed in embryonic stem (ES) cells. Previous studies have evidenced a role in neurogenesis (Lemkine et al., 2005) that is further supported by the demonstration that TR α 1 mediates neuronal-like differentiation in ES cells and in the PC12 cell line (Munoz et al., 1993). These observations, together with the present demonstration that in vivo TR α 1 (but not TR β 2) mRNA expression coincided chronologically with that of TRH in hypothalamus and the stimulatory effect of T3 on TRH mRNA levels in immature cultures, suggest that TR α 1 may contribute to the early enhancement of TRH expression. However, since there is no evidence that the TRH promoter

Fig. 5 – Thyroid hormone receptor transcripts and proteins were regulated during hypothalamus ontogeny. (A) Levels of thyroid hormone receptor isoform α 1, α 2, β 1 and β 2 mRNAs from hypothalamus of 14, 16, 17, 18 and 20 days of embryonic period (E), birth (P0) and 2, 3 and 5 months of adult period (A) of rat were determined by RT-PCR, quantified by computer-assisted densitometry in arbitrary units and corrected against 18S fraction of RNA. Values are represented as percentages. E14 was taken as control=100%. (B) Protein levels of thyroid hormone receptor isoforms α 1, β 1 and β 2 from hypothalamus of embryonic day (E) 17, 18 and 20, birth (P0) and 2, 3 and 5 months of adult stage (A) were determined by Western blot and quantified by computer-assisted densitometry in arbitrary units and corrected against actin. Values are represented as percentages. E17 was taken as control=100%. (C) TRH mRNA levels from hypothalamus of 14, 16, 17, 18, 20 days of embryonic period (E), birth (P0) and 2, 3 and 5 months of adult period (A) of rat were determined by RT-PCR, quantified by computer-assisted densitometry in arbitrary units and corrected against 18S fraction of RNA. Values are represented as percentages. E14 was taken as control=100%. Means of two independent experiments are shown, $n=2$.

has a positive thyroid hormone response element, TR α 1 effect may be indirect.

The temporal expression patterns of TR α 1 and TR β 2 (this work) and the presence of a putative TRE in the TR β 2 promoter region (Table 1) (Suen et al., 1994) suggest that TR α 1 could regulate positively the expression of TR β 2 during early stages of development. This hypothesis is analogous to the conclusion of previous studies demonstrating that TR β 1 expression is directly regulated by TR α 1 through two TREs present on the TR β 1 promoter in a ligand-dependent manner (Suzuki et al., 1994). This is in accordance with the present data showing that while the expression profile of TR β 2 is sustained in vivo, its expression is decreased in long-term cultures deprived of T3 and addition of this hormone to the culture induced the expression of TR α 1 and TR β 2.

Long time treatment with T3 inhibited TRH expression in 12 DIV cultures. This could be facilitated by TR α 1 mediated TR β 2 up-regulation. Additionally, TR β 1 may also inhibit TRH expression (Dupre et al., 2004). Therefore, TR β 1 and β 2 could together contribute to the inhibitory effect of T3 on TRH expression at this stage of the culture development (12 DIV). Interestingly, this effect correlates in time with the initiation of the negative feedback that TH exerts on TRH mRNA levels in the PVN (Taylor et al., 1990a). Mice that lack TR genes individually have no major defects in HPT axis function, possibly because of a compensatory mechanism between the TRs. In contrast, TR α 1 $^{-/-}$ β 2 $^{-/-}$ mice show increased TRH mRNA levels in the hypothalamic PVN (Calza et al., 2000). This may result from the loss of the TR β 2-mediated negative feedback on TRH expression. However, whether T3 could regulate TR β 2 and TRH expression through TR α 1 during the hypothalamus development is still an open question.

On the other hand, mature cultures (18 DIV) showed a rapid (1 h) decrease in TRH mRNA expression after T3 treatment. Since at 18 DIV the culture consists basically of mature neurons (Perez-Martinez et al., 2001), at this stage a T3 dependent increase in TR β 2 expression may contribute to counterbalance TR α 1 action. This is particularly interesting in terms of the developmental changes reported for serum T4/T3 in vivo. Serum thyroid hormone levels gradually increase during the perinatal period and then decrease around P15 in mouse and rat (Zoeller et al., 2000). Since 18 DIV corresponds approximately to P15, the switch from a positive effect to a negative feedback of T3 on TRH expression may be related to changes in the thyroid hormones circulating levels.

Although most of the literature supports that thyroid hormones act predominantly through a genomic mechanism, we cannot discard the possibility that the positive effect observed in the present study resulted from a non-genomic effect. Recently, the integrin α V β 3 has been described as the cell surface receptor for thyroid hormones (Davis et al., 2005; Bergh et al., 2005). Integrin engagement activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK-ERK1/2) (Davis et al., 2008). Consequently, the ERK1/2-dependent serine phosphorylation of the TR β 1 results in transcriptional activity (de-repression) due to shedding of corepressors proteins and recruitment of coactivators (Davis et al., 2000). Similarly, the nuclear estrogen receptor α 1 phosphorylation by a MAPK dependent pathway constitutes another example of thyroid hormones acting at the cell surface (Tang et al., 2004). Therefore, thyroid hormone signaling may involve an interface between non-genomic and genomic mechanisms of action. We have recently shown that MAPK activity regulates TRH mRNA levels in primary cultures of hypothalamic cells (Ubieta et al., 2007; Cote-Velez et al., 2008). Further studies are required to clarify whether MAPK can influence the positive effect of T3 on TRH mRNA levels.

T3 effects on TRH expression were abolished or delayed in the absence of serum. These results suggest that serum factors modulate the stimulatory effect of T3 on maturation of TRH expression, and are critical for the apparition of the negative feedback. Previous studies in our group have shown that TRH expression is up-regulated in the presence of serum (Pérez-Martínez, L., Charli, J.-L. and Joseph-Bravo, P., unpublished results). It is tempting to speculate that the serum response factor is involved in such regulation, as reported for SM22 gene expression (Qiu et al., 2003). In addition, the delay in the stimulatory effect of T3 in 12 DIV serum-free cultures could result from the ability of the TRs to interact with corepressor molecules; these could be activated for example by the epidermal growth factor (Hong et al., 1998), which is present in serum.

Previous data have suggested that T3 participates in the general neuronal differentiation program by regulating the expression of neuronal markers. However, the T3 signaling may not have the same spatio-temporal influence to regulate each particular neurotransmitter gene expression. Accordingly, we showed that regulation of CRH expression by T3 was distinct to that observed for TRH expression. Nevertheless, a wider spectrum of T3 action on other neuroendocrine phenotypes cannot be discarded. Previous studies have

Table 1 – Putative thyroid response element in the TR β 2 promoter in mammals.

Sp	Entrez Gene (gene id)	Sequences
<i>Homo sapiens</i>	7068	–355 ctgggtggagggtcattcctacctgcctgc –326
<i>Macaca mulatta</i>	699969	–317 ctgggtggagggtcattcctacctgcctgc –288
<i>Pan troglodytes</i>	470771	–355 ctgggtggagggtcattcctacctgcctgc –326
<i>Mus musculus</i>	21834	–345 ccaagtacagaccattcctacctgcctgc –316
<i>Rattus norvegicus</i>	24831	–372 tcaaggagaggccatttctacctgcctgc –343
<i>Equus caballus</i>	100051615	–351 ctgggtggagggtcattcctacctgcctgc –322
<i>Canis lupus familiaris</i>	403599	–348 cgggtgatgggtcattcctacctgcctgc –319

Computer analysis of the TR β 2 5'-UTR region showed the presence of a putative hormone response element which is highly conserved among different organisms. The sequence in italics highlights the TRE (Suen et al., 1994). Positions are relative to the transcription start site.

shown that the maturation of hypothalamic dopaminergic neurons is enhanced by T3 (Puymirat et al., 1983).

The supply in due time of a proper concentration of T3 is determinant for normal brain development. The data we presented suggest that T3 plays a key role not only on the HPT axis function but also on its development. The mechanism mediating the early effect of T3 on hypothalamic TRH expression is unknown. Among the various alternative possibilities, T3 may promote TRH expression via TR α 1 activation. In addition TR α 1 may enhance TR β 2 expression that, at latter stages, would negatively regulate TRH expression. Therefore, an adequate balance in time and concentration of TR isoforms may determine the set point for TRH expression to consequently regulate thyroid hormone levels. Whether an imbalance during development in the neuroendocrine TR isoforms expression could result in neurological diseases (ADHD, obesity, anorexia nervosa, subclinical hypothyroidism, etc.) (Siesser et al., 2005, 2006; Reinehr et al., 2008) requires future attention.

4. Experimental procedures

4.1. Animals

Animals used were Wistar rats raised at the animal facility of the Instituto de Biotecnología, UNAM. Animals were maintained in standard environmental conditions (lights on between 0700 and 1900 h, temperature 21 ± 2 °C) and received rat chow and tap water ad libitum. Animal care and protocols were approved by the Animal Care and Ethics Committee of the Institute following the guidelines for the use of animals in neuroscience research of the Society for Neuroscience, USA. Adult male rats were used for the in vivo experiments.

4.2. Cell culture

Hypothalamic primary cultures were prepared from E17 rat embryos as previously described (Joseph-Bravo et al., 2002);

the sex of the embryos was not determined. Briefly, pregnant rats were anesthetized with pentobarbital (33 mg/kg b.w.) and the embryos removed individually. The hypothalamus was then excised through an imaginary line between both eye and ear superior edge; the dissected area was limited by the optic chiasm and lateral sulcus including mammillary bodies to a 2–3 mm depth avoiding thalamic area. Hypothalami were enzymatically dissociated with trypsin (Sigma) and cell viability monitored by trypan blue exclusion. Cells (2984/mm²) were plated in a final volume of 500 μ l of DMEM supplemented (S-DMEM) with 50 mg/ml glucose (Sigma), 2 mM glutamine (Sigma), 3.3 μ g/ml insulin (Sigma), 1% antibiotic-antimycotic (GIBCO), 1% vitamin solution (GIBCO) and 10% of fetal bovine serum (FBS; GIBCO). After 4 DIV, cultures were treated with 10 μ M cytosine-D-arabinofuranoside (Sigma). Half of the medium was replaced every second day with fresh S-DMEM. Cultures were maintained for different periods of time at 37 °C in a humidified air/7% CO₂ incubator. In general T3 treatments were performed in S-DMEM. Since FBS contains thyroid hormones, the approximate final concentration of T3 in control dishes was 3×10^{-10} M. Treatments with T3 were carried out with 1×10^{-9} to 1×10^{-6} M T3 (Sigma) in 0.01 N NaOH. Each culture had its own set of controls with the equivalent concentration of NaOH.

For serum-free culture, cells were plated in a final volume of 500 μ l Neurobasal medium (GIBCO) containing B27 supplement (GIBCO) and 1×10^{-7} M 17 β -estradiol (Sigma). Photomicrographs were taken at different DIV using an inverted Diaphot microscope (Nikon) and images prepared using Adobe Photoshop.

4.3. Immunoblot analysis

Western blot analysis was performed as described previously (Perez-Martinez and Jaworski, 2005). Briefly, frozen hypothalamic tissue was sonicated in lysis buffer (25 mM Hepes, pH 7.7, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 0.5 mM DTT, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 5 mM NaF, 4 mM PMSF, 1 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin)

Table 2 – PCR conditions used to determine transcript levels during the rat hypothalamus development.

Primers	5'-forward and 5'-reverse sequences	Annealing temperature (°C)	PCR cycles	Amplification product size (bp)	Reference
TRH	5'-CCCTGGATGGAGTCTGATGT 5'-GACAGCTAGTGAAGGGAACAGG	62	26	358	Lechan et al., 1986
TR α 1	5'-ATGGCCATGGACCTGGTTC 5'-GGGCACTCGACTTTTCATGTG	66	25	840	Thompson et al., 1987
TR α 2	5'-ATGGCCATGGACCTGGTTC 5'-GCATTCCGAGAAGCTGCTG	69	27	801	Mitsuhashi et al., 1988
TR β 1	5'-GGTGTACCAAGTTCCACAC 5'-GTTCAACAATGGGTGCTTGTC	67	34	830	Koenig et al., 1988
TR β 2	5'-CATGGCCCTGAGTCAGTACA 5'-GCACTGGTTTACGGGTGACTT	58	35	292	Buzzard et al., 2000
CRH	5'-GCCCGCAGCGGTTGAA 5'-GACCGCTCTCCCTCTCCAG	63	30	325	Jingami et al., 1985
Cyclophilin	5'-GGGGAGAAAGGATTGGCTA 5'-ACATGCTTGCCATCCAGCC	62	26	259	Danielson et al., 1988

For each pair of oligonucleotides the top sequence is the forward primer, the bottom sequence is the reverse primer.

and incubated for 30 min at 4 °C. Cell lysates were then spun at $13,000 \times g$ for 15 min at 4 °C. Protein content was determined by Bradford assay (Bradford, 1976).

Total cell lysates (40 µg) were fractionated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Schleicher & Schuell). Membranes were blocked with 5% nonfat milk in Tris-buffer saline (TBS; 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl), followed by overnight incubation at 4 °C with the indicated antibody diluted in TBS with 0.05% Tween-20 (TBS-T). After three washes with TBS-T, membranes were incubated with the appropriate secondary antibody coupled to horseradish peroxidase, and immunocomplexes visualized by enhanced chemiluminescence according to manufacturer's instructions (Lumi-Light^{PLUS} kit; Roche). Primary antibodies for Western blotting included rabbit polyclonal anti-TR α 1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc.), mouse monoclonal anti-TR β 1 (1:200; Santa Cruz Biotechnology Inc.), rabbit polyclonal anti-TR β 2 (1:200; Upstate Biotechnology), and goat polyclonal anti-actin (1:5000; Santa Cruz Biotechnology Inc.).

4.4. RT-PCR

RNA was extracted from frozen hypothalamus tissue or cells as previously described (Perez-Martinez et al., 2001). Reverse transcription was performed with 1 µg of RNA using the M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) in the presence of oligo (dT)₁₅ primer, synthesized at the Institute's Macromolecule Synthesis Unit. PCR was carried out in a total reaction volume of 50 µl. PCRs were performed using 50 pmol each of either the TR α 1-, TR α 2-, TR β 1-, TR β 2-, TRH-, CRH- or cyclophilin-specific forward and reverse primers (Lechan et al., 1986; Thompson et al., 1987; Mitsuhashi et al., 1988; Koenig et al., 1988; Buzzard et al., 2000; Jingami et al., 1985; Danielson et al., 1988), 1 µl of dNTP mix (20 mM each; Boehringer) and 1/5 of the RT reaction product. PCR cycling conditions included one cycle of melt temperature at 94 °C and extension at 72 °C. The primer sequence, annealing temperature for each pair of oligonucleotides, number of PCR cycles and product size are shown in Table 2.

PCR products were electrophoresed in a 2% agarose gel, bands stained with ethidium bromide and quantified in arbitrary units by computer-assisted densitometry. For the in vivo ontogeny data, the expression of the TR isoforms mRNA was normalized to the densitometry signal of the 18S RNA fraction. For the rest of the experiments data were normalized to the non-developmentally regulated gene cyclophilin (Al-Bader and Al-Sarraf, 2005).

4.5. Data presentation

For data in primary cultures, each experiment consisted of two to three replicate dishes with control and experimental groups; *n* is the total number of dishes used for each group. Results were calculated as percentage of control or first time point value. Data were calculated as the mean $\pm$ SD and analyzed by Kruskal–Wallis test. The differences between groups were analyzed by the nonparametric Mann–Whitney U-test followed by the Bonferroni correction. Data were considered significant at $p < 0.05$. In general, data correspond to at least two independent experiments.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Patricia Joseph-Bravo and Dr. Gustavo Pedraza-Alva for insightful scientific discussions. We also thank M. Villa, and E. Martel for technical assistance, as well as S. González for animal care. This work was supported by grants from CONACYT (61208) and DGAPA-UNAM (IN227506-3; IN224909).

REFERENCES

- Al-Bader, M.D., Al-Sarraf, H.A., 2005. Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res. Dev.* 156, 38–45.
- Baram, T.Z., Lerner, S.P., 1991. Ontogeny of corticotropin releasing hormone gene expression in rat hypothalamus—comparison with somatostatin. *Int. J. Dev. Neurosci.* 9, 473–478.
- Bergh, J.J., Lin, H.Y., Lansing, L., Mohamed, S.N., Davis, F.B., Mousa, S., Davis, P.J., 2005. Integrin α vb3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. *Endocrinology* 146, 2864–2871.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bradley, D.J., Towle, H.C., Young 3rd, W.S., 1992. Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* 12, 2288–2302.
- Burgunder, J.M., Taylor, T., 1989. Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology* 49, 631–640.
- Buzzard, J.J., Morrison, J.R., O' bryan, M.K., Song, Q., Wreford, N.G., 2000. Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol. Reprod.* 62, 664–669.
- Calza, L., Forrest, D., Vennstrom, B., Hökfelt, T., 2000. Expression of peptides and other neurochemical markers in hypothalamus and olfactory bulb of mice devoid of all known thyroid hormone receptors. *Neuroscience* 101, 1001–1012.
- Clerget-Froidevaux, M.S., Seugnet, I., Demeneix, B.A., 2004. Thyroid status co-regulates thyroid hormone receptor and co-modulator genes specifically in the hypothalamus. *FEBS Lett.* 569, 341–345.
- Cote-Velez, A., Perez-Martinez, L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2008. The PKC and ERK/MAPK pathways regulate glucocorticoid action on TRH transcription. *Neurochem. Res.* 33, 1582–1591.
- Chan, S., Kilby, M.D., 2000. Thyroid hormone and central nervous system development. *J. Endocrinol.* 165, 1–8.
- Danielson, P.E., Forss-Petter, S., Brow, M.A., Calavetta, L., Douglass, J., Milner, R.J., Sutcliffe, J.G., 1988. p1B15: a cDNA clone of the rat mRNA encoding cyclophilin. *DNA* 7, 261–267.
- Davis, P.J., Shih, A., Lin, H.Y., Martino, L.J., Davis, F.B., 2000. Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR. *J. Biol. Chem.* 275, 38032–38039.
- Davis, P.J., Davis, F.B., Cody, V., 2005. Membrane receptors mediating thyroid hormone action. *Trends Endocrinol. Metab.* 16, 419–435.
- Davis, P.J., Leonard, J.L., Davis, F.B., 2008. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front. Neuroendocrinol.* 29, 211–218.
- Dias, A.C., Modulo, C.M., Jorge, A.G., Braz, A.M., Jordao Jr., A.A., Filho, R.B., De Paula, J.S., Rocha, E.M., 2007. Influence of thyroid

- hormone on thyroid hormone receptor beta-1 expression and lacrimal gland and ocular surface morphology. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 3038–3042.
- Dupre, S.M., Guissouma, H., Flamant, F., Seugnet, I., Scanlan, T.S., Baxter, J.D., Samarut, J., Demeneix, B.A., Becker, N., 2004. Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 145, 2337–2345.
- Forrest, D., Reh, T.A., Rusch, A., 2002. Neurodevelopmental control by thyroid hormone receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 12, 49–56.
- Friedrichsen, S., Christ, S., Heuer, H., Schafer, M.K., Mansouri, A., Bauer, K., Visser, T.J., 2003. Regulation of iodothyronine deiodinases in the Pax8-/- mouse model of congenital hypothyroidism. *Endocrinology* 144, 777–784.
- Gahr, M., 2004. Hormone-dependent neural plasticity in the juvenile and adult song system: what makes a successful male? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1016, 684–703.
- Garza, R., Puymirat, J., Dussault, J.H., 1990. Influence of soluble environmental factors on the development of fetal brain acetylcholinesterase-positive neurons cultured in a chemically defined medium: comparison with the effects of L-triiodothyronine (L-T3). *Brain Res. Dev. Brain Res.* 56, 160–168.
- Glass, C.K., Rosenfeld, M.G., 2000. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141.
- Guerra-Crespo, M., Ubieta, R., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., Perez-Martinez, L., 2001. BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur. J. Neurosci.* 14, 483–494.
- Hong, S.H., Wong, C.W., Privalsky, M.L., 1998. Signaling by tyrosine kinases negatively regulates the interaction between transcription factors and SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) corepressor. *Mol. Endocrinol.* 12, 1161–1171.
- Ishii, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, T., Hashimoto, K., Shibusawa, N., Onigata, K., Morikawa, A., Mori, M., 2004. Aberrant dynamics of histone deacetylation at the thyrotropin-releasing hormone gene in resistance to thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* 18, 1708–1720.
- Jingami, H., Mizuno, N., Takahashi, H., Shibahara, S., Furutani, Y., Imura, H., Numa, S., 1985. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat corticotropin-releasing factor precursor. *FEBS Lett.* 191, 63–66.
- Joseph-Bravo, P., Perez-Martinez, L., Lezama, L., Morales-Chapa, C., Charli, J.L., 2002. An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 9, 93–104.
- Kalb, R.G., Hockfield, S., 1992. Activity-dependent development of spinal cord motor neurons. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 17, 283–289.
- Karolyi, I.J., Dootz, G.A., Halsey, K., Beyer, L., Probst, F.J., Johnson, K.R., Parlow, A.F., Raphael, Y., Dolan, D.F., Camper, S.A., 2007. Dietary thyroid hormone replacement ameliorates hearing deficits in hypothyroid mice. *Mamm. Genome* 18, 596–608.
- Koenig, R.J., Warne, R.L., Brent, G.A., Harney, J.W., Larsen, P.R., Moore, D.D., 1988. Isolation of a cDNA clone encoding a biologically active thyroid hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5031–5035.
- Koibuchi, N., Iwasaki, T., 2006. Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals. *Endocr. J.* 53, 295–303.
- Koibuchi, N., Jingu, H., Iwasaki, T., Chin, W.W., 2003. Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. *Cerebellum* 2, 279–289.
- Koller, K.J., Wolff, R.S., Warden, M.K., Zoeller, R.T., 1987. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7329–7333.
- Langlois, M.F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J.D., Hollenberg, A.N., Wondisford, F.E., 1997. A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *J. Biol. Chem.* 272, 24927–24933.
- Leader, J.E., Wang, C., Fu, M., Pestell, R.G., 2006. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1589–1596.
- 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.
- Lemkine, G.F., Raj, A., Alfama, G., Turque, N., Hassani, Z., Alegria-Prevot, O., Samarut, J., Levi, G., Demeneix, B.A., 2005. Adult neural stem cell cycling in vivo requires thyroid hormone and its alpha receptor. *FASEB J.* 19, 863–865.
- Lezoualc'h, F., Hassan, A., Abdel-Tawab, H., Puymirat, J., Demeneix, B.A., 1994. Precocious auto-induction of thyroid hormone receptors in embryonic chick hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.* 180, 197–202.
- Loudes, C., Faivre-Bauman, A., Barret, A., Grouselle, D., Puymirat, J., Tixier-Vidal, A., 1983. Release of immunoreactive TRH in serum-free cultures of mouse hypothalamic cells. *Dev. Brain Res.* 9, 231–234.
- Markakis, E.A., 2002. Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front. Neuroendocrinol.* 23, 257–291.
- Mitsuhashi, T., Tennyson, G., Nikodem, V., 1988. Nucleotide sequence of novel cDNAs generated by alternative splicing of a rat thyroid hormone receptor gene transcript. *Nucleic Acids Res.* 16, 5697.
- Munoz, A., Wrighton, C., Seliger, B., Bernal, J., Beug, H., 1993. Thyroid hormone receptor/c-erbA: control of commitment and differentiation in the neuronal/chromaffin progenitor line PC12. *J. Cell Biol.* 121, 423–438.
- Niquet, J., Perez-Martinez, L., Guerra, M., Grouselle, D., Joseph-Bravo, P., Charli, J., 2000. Extracellular matrix proteins increase the expression of pro-TRH and pro-protein convertase PC1 in fetal hypothalamic neurons in vitro. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 120, 49–56.
- Obregon, M.J., Mallol, J., Pastor, R., Morreale De Escobar, G., Escobar Del Rey, F., 1984. L-thyroxine and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* 114, 305–307.
- Perez-Martinez, L., Jaworski, D.M., 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J. Neurosci.* 25, 4917–4929.
- Perez-Martinez, L., Charli, J.L., Joseph-Bravo, P., 2001. Development of pro-TRH gene expression in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 130, 73–81.
- Porterfield, S.P., Hendrich, C.E., 1992. Tissue iodothyronine levels in fetuses of control and hypothyroid rats at 13 and 16 days gestation. *Endocrinology* 131, 195–200.
- Puymirat, J., Barret, A., Picart, R., Vigny, A., Loudes, C., Faivre-Bauman, A., Tixier-Vidal, A., 1983. Triiodothyronine enhances the morphological maturation of dopaminergic neurons from fetal mouse hypothalamus cultured in serum-free medium. *Neuroscience* 10, 801–810.
- Qiu, P., Feng, X.H., Li, L., 2003. Interaction of Smad3 and SRF-associated complex mediates TGF-beta1 signals to regulate SM22 transcription during myofibroblast differentiation. *J. Mol. Cell Cardiol.* 35, 1407–1420.
- Reinehr, T., Isa, A., De Sousa, G., Dieffenbach, R., Andler, W., 2008. Thyroid hormones and their relation to weight status. *Horm. Res.* 70, 51–57.
- Sakurai, A., Miyamoto, T., Degroot, L.J., 1992. Cloning and characterization of the human thyroid hormone receptor beta 1 gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 78–84.

- Santisteban, P., Bernal, J., 2005. Thyroid development and effect on the nervous system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 6, 217–228.
- Segerson, T.P., Kauer, J., Wolfe, H.C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I.M., Lechan, R.M., 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238, 78–80.
- Siesser, W.B., Cheng, S.Y., McDonald, M.P., 2005. Hyperactivity, impaired learning on a vigilance task, and a differential response to methylphenidate in the TRbetaPV knock-in mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 181, 653–663.
- Siesser, W.B., Zhao, J., Miller, L.R., Cheng, S.Y., McDonald, M.P., 2006. Transgenic mice expressing a human mutant beta1 thyroid receptor are hyperactive, impulsive, and inattentive. *Genes Brain Behav.* 5, 282–297.
- Suen, C.H., Yen, P.M., Chin, W.W., 1994. *In vitro* transcriptional studies of the roles of the thyroid hormone (T_3) response elements and minimal promoters in T_3 -stimulated gene transcription. *J. Biol. Chem.* 269, 1314–1322.
- Suzuki, S., Miyamoto, T., Opsahl, A., Sakurai, A., Degroot, L.J., 1994. Two thyroid hormone response elements are present in the promoter of human thyroid hormone receptor beta 1. *Mol. Endocrinol.* 8, 305–314.
- Tang, H.Y., Lin, H.Y., Zhang, S., Davis, F.B., Davis, P.J., 2004. Thyroid hormone causes mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of the nuclear estrogen receptor. *Endocrinology* 145, 3265–3272.
- Taylor, T., Gyves, P., Burgunder, J.M., 1990a. Thyroid hormone regulation of TRH mRNA levels in rat paraventricular nucleus of the hypothalamus changes during ontogeny. *Neuroendocrinology* 52, 262–267.
- Taylor, T., Wondisford, F.E., Blaine, T., Weintraub, B.D., 1990b. The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology* 126, 317–324.
- Thompson, C.C., Weinberger, C., Lebo, R., Evans, R.M., 1987. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science* 237, 1610–1614.
- Ubieta, R., Uribe, R.M., Gonzalez, J.A., Garcia-Vazquez, A., Perez-Monter, C., Perez-Martinez, L., Joseph-Bravo, P., Charli, J.L., 2007. BDNF up-regulates pre-pro-TRH mRNA expression in the fetal/neonatal paraventricular nucleus of the hypothalamus. Properties of the transduction pathway. *Brain Res.* 1174, 28–38.
- Yen, P.M., 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol. Rev.* 81, 1097–1142.
- Zhang, J., Lazar, M.A., 2000. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 439–466.
- Zoeller, R.T., Dowling, A.L., Vas, A.A., 2000. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls exerts thyroid hormone-like effects on the expression of RC3/neurogranin and myelin basic protein messenger ribonucleic acids in the developing rat brain. *Endocrinology* 141, 181–189.

La participación de las hormonas tiroideas en el desarrollo y función del sistema nervioso

M. en C. Alfonso Carreón Rodríguez

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dra. Patricia I. Joseph Bravo

Laboratorio de Neuroendocrinología Molecular y Celular

Departamento de Genética del Desarrollo y

Fisiología Molecular

Instituto de Biotecnología, UNAM,

Cuernavaca, Morelos.

La influencia de las hormonas tiroideas sobre el desarrollo del sistema nervioso, empieza desde las etapas más tempranas en la evolución del feto (figura 1). Antes del inicio de la función tiroidea, las concentraciones séricas de hormonas tiroideas dependen del funcionamiento tiroideo de la madre. Se han encontrado hormonas tiroideas en el embriotrofoblasto de la rata a los 11 días después de la concepción. Luego, conforme madura la función tiroidea en el feto, las concentraciones hormonales aumentan; sin embargo, en el momento del nacimiento la concentración de hormonas de origen materno en el cordón umbilical es de alrededor de 30%. Algunos genes, como el de RC3/neurogranina expresado en cerebro fetal, son regulados por hormona tiroidea de origen materno. Las hormonas tiroideas se acumulan en cerebro e hígado durante la mitad de la gestación y se han demostrado receptores tiroideos en estos órganos durante dichas etapas.

Durante el primer trimestre del desarrollo humano, el cerebro es el único de todos los tejidos fetales en donde se puede detectar triyodotironina (T3).

Además existen altas concentraciones de esta hormona, lo que sugiere que existe una actividad de 5'-monodesyodación en el feto humano durante el final del primer trimestre y el inicio del segundo. A las 10-12 semanas de gestación se detecta tirotropina (TSH) en la hipófisis fetal y a partir del segundo trimestre inicia la función tiroidea. El incremento progresivo en la expresión de tres isoformas α y dos β de la NaKATPasa en cerebros fetales de rata desde los 12 hasta los 16 días de cultivo, así como la distribución homogénea en prolongaciones neurales, son ejemplos de procesos dependientes de la función de las hormonas tiroideas en estas etapas.

Hacia el final de la gestación se produce la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, en el que se atribuye una función importante a la hormona liberadora de tirotropina (TRH) materna que, a diferencia de la TSH del mismo origen, si puede atravesar la placenta. La TRH fetal se detecta en el feto al final del tercer trimestre, al mismo tiempo que se produce una creciente acumulación de yodo por la glándula tiroidea.

Al momento del nacimiento, en la rata, las concentraciones circulantes de hormonas tiroideas son muy bajas y luego la tetrayodotironina (T4) se incrementa rápidamente entre los días cuatro y 16 posnatales, cuando alcanza sus concentraciones pico. T3 sigue un patrón paralelo con una concentración pico hasta el día 28. Relacionado con estos cambios, también se observa incremento de TRH hipotalámica desde una concentración mínima al nacimiento hasta un máximo entre los 16 y 28 días de edad. En tanto las concentraciones séricas de TSH se incrementan a niveles máximos durante la primera semana posnatal.

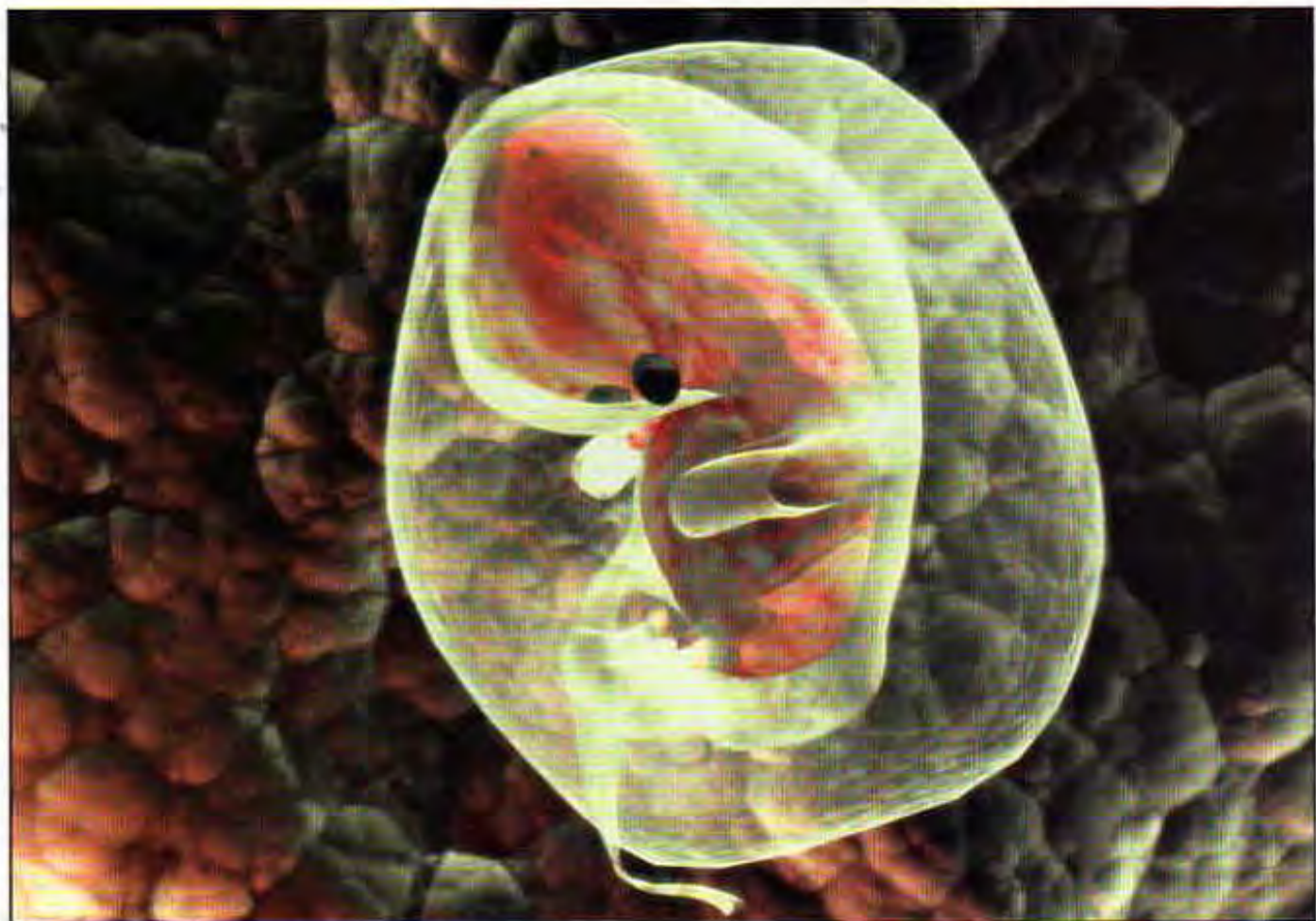


Figura 1. Embrión humano con receptores tiroideos listos.

Tanto la densidad celular como las hormonas tiroideas son factores determinantes de la diferenciación entre neuronas, astrocitos u oligodendrocitos en etapas embrionarias, en parte por estimular la síntesis y organización de varias proteínas del citoesqueleto neuronal como tubulina, actina y vimentina.

En los casos de hipertiroidismo durante los primeros días del nacimiento, disminuyen los niveles de sustancia P y TRH en las astas dorsales y ventrales de la médula espinal respectivamente. En cambio, el hipotiroidismo incrementa los niveles de sustancia P en el asta dorsal, de TRH y serotonina en el asta ventral y del ácido 5-hidroxiindolacético en ambas astas. En contraste, la deficiencia de hormonas tiroideas produce retraso mental y anormalidades motoras, entre otras razones debido a la alteración en el desarrollo neuronal (figura 2). En estudios *in vitro* sobre células de fetos de ratón de 16 días de gestación, T3 tiene un claro efecto sobre la elongación de las neur-

tas. Por otra parte, se ha mostrado que el hipotiroidismo materno afecta la expresión de la proteína neuroendocrina específica A (NSP-A), tanto en la zona proliferativa de la corteza fetal como, más tarde en el desarrollo, en las células cerebelares de Purkinje. Asimismo, disminuye la expresión del gen de neurofilamento en diversas regiones.

El desarrollo del sistema nervioso, en particular el desarrollo neuronal, no sólo depende de concentraciones adecuadas de hormonas tiroideas, sino también de la expresión correcta de sus receptores, tanto en las concentraciones como en las regiones precisas. Las neuronas y la glía tienen la capacidad de unir hormonas tiroideas en el núcleo. Dicha unión ocurre por medio de receptores específicos, de los cuales se han descrito cuatro isoformas importantes, dos generadas en el locus *erbA α* del cromosoma humano 17, que codifica las proteínas TR α 1 y TR α 2, y dos generadas en el locus *erbA β* del cromosoma 3, que codifica las proteínas TR β 1 y

TR β 2. Estas isoformas tienen diferentes patrones de expresión espacio-temporal en el sistema nervioso fetal y posnatal. Las isoformas α se expresan en altos niveles en la placa neocortical fetal, que es un sitio de diferenciación neuronal cortical, en tanto que las isoformas β muestran un patrón de expresión más restringido a zonas de proliferación de neuroblastos, como el trigono germinal y la lámina ventricular cortical. La isoforma TR β 1 es responsable, en ausencia de T3, de regular la expresión del gen PCP-2 en las células cerebelares de Purkinje en el desarrollo neonatal de la rata; en presencia de T3 dicha expresión se incrementa hasta 40%.

TR β 1 también se relaciona con la expresión de otros genes del cerebelo en desarrollo: *Srg1*, que forma parte de la familia de sinaptotagmina y *hr*, un homólogo de hairless. Estos genes son algunos de los más rápidamente regulados por la acción tiroidea (<4h) y el *hr* es hasta el momento el más altamente inducido (>10 veces). La expresión de las isoformas TR α 1, TR α 2 y el homólogo truncado de TR α 3 de la rata, así como la isoforma TR β 1, se han identificado durante el primer trimestre del cerebro humano fetal. Todas las isoformas TR α incrementan su expresión entre las 8.1 y 13.9 semanas de gestación (sg), en tanto que la isoforma TR β 1 muestra un nadir entre las 8.4 y 12 sg. Estos datos sugieren un papel importante de TR α 1 en el desarrollo del cerebro humano fetal durante el primer trimestre.

La presencia y distribución diferencial de receptores tiroideos asociados también con la presencia de desiodasas, brinda especificidad temporal y espacial sobre el desarrollo de los tejidos, en particular en el neurodesarrollo. Dicha especificidad se manifiesta por la regulación de determinados genes en regiones particulares del sistema nervioso central; por ejemplo, en etapas embrionarias (E16/17) se ha descrito la regulación de la expresión del segundo mensajero calmodulina cinasa IV en células telencefálicas de la rata, por T3.

Adicionalmente, después de cambios agudos en los niveles de T4 administrada antes de la presentación de la función tiroidea en el feto normal, se afecta la expresión de al menos ocho de 11 genes analizados, entre ellos NSP y Oct-1 que modifican su concentración cortical. Estos cambios están, además, relacionados de manera directa con presencia de receptores tiroideos en esta región, lo que sugiere una acción directa de las hormonas tiroideas sobre la regulación de la expresión de dichos genes.

En el síndrome de retardo en el crecimiento uterino, existe disminución en la concentración de T3 y T4 libres, en el que se ha demostrado que también existe una disminución en la expresión de todas las isoformas de receptores tiroideos, al menos en la corteza y el cerebelo, en comparación con fetos que presentan desarrollo normal. La hipoxia gestacional produce un incremento en los niveles de RNAm TR α 2 y TR α 1, además de Glut3, Glut4 y HIF-1 α . En ratones que carecen de las isoformas TR α 1, TR β 1 y TR β 2 (*knockout*) se observan incrementos en los niveles de RNAm de TRH en el núcleo paraventricular (NPV) hipotalámico, en los núcleos del rafe medular y en las motoneuronas, así como disminución de estos niveles



Figura 2. Las concentraciones inadecuadas de hormonas tiroideas, suelen producir severos trastornos a nivel cerebral.

en amígdala. En estos animales los niveles de RNAm de galanina en el NPV y la inmunorreactividad a galanina en la eminencia media fueron más bajos que en los animales control. Se encontró también disminución en el RNAm de tirosina hidroxilasa en el núcleo arcuato.

En la capa glomerular del bulbo olfatorio existe una disminución en la intensidad de marcaje de tirosina hidroxilasa y calbindina, así como de los niveles de RNAm de la tirosina hidroxilasa. Además de las correlaciones específicas entre la presencia de las isoformas de receptores y genes potencialmente susceptibles de responder a hormona tiroidea, se han investigado efectos generales sobre el desarrollo celular en relación con la interacción hormona-receptor. Por ejemplo, en el cerebelo aparentemente la presencia de la isoforma TR α 1 en ausencia de T₃ tiene un efecto represor sobre la migración de las células granulares y el crecimiento de las células de Purkinje. Esta represión es liberada cuando existe delección de dicha isoforma o en presencia de T₃.

En el humano las mutaciones de las isoformas TR β producen síndrome de resistencia a hormonas tiroideas (síndrome de Refetoff), pero no se ha reportado mutación de las isoformas α . No obstante, en el ratón la ausencia de la isoforma TR α 1, además de sus efectos sobre el desarrollo del cerebelo, se ha relacionado con anormalidades conductuales de origen hipocámpal. Estos datos se correlacionan con menos terminales GABAérgicas sobre las neuronas piramidales de CA1 y sugieren que el receptor tiroideo TR α 1 está involucrado en la regulación de la estructura y función hipocámpal.

Las deficiencias de hormonas tiroideas que se encuentran en el hipotiroidismo congénito pueden producir graves trastornos en el desarrollo del niño: problemas de conducta, locomotores, lenguaje, audición y aprendizaje. De aquí la necesidad de establecer un tratamiento oportuno con la suplementación adecuada de hormonas tiroideas. No obstante, aun con el establecimiento de un tratamiento de suplementación adecuado y oportuno, se pueden observar diferencias en el desarrollo de los niños que sufrieron hipotiroidismo *in utero* cuando se comparan con aquellos que tuvieron un desarrollo normal. Tales diferencias se manifiestan en anormalidades del lenguaje, daños en la ubicación espacio-temporal y coeficiente intelectual menor que el promedio. Además ponen de manifiesto

el importante papel que tienen las hormonas tiroideas en el desarrollo, particularmente del sistema nervioso, y que sus bajos niveles o ausencia pueden afectar lugares y momentos clave de la maduración neuronal. Aunque tales efectos sean sutiles, inciden en las funciones normales de un individuo, las cuales pueden sufrir daño permanente aun con tratamiento. En madres que consumen concentraciones limitadas de yodo, los niveles circulantes de hormonas tiroideas pueden disminuir hasta valores entre 25-50% de lo normal, lo cual puede ser suficiente para evitar la presentación de rasgos fenotípicos del hipotiroidismo congénito. En contraste, cuando la madre sufre de hipotiroidismo por cualquier causa se asocia con un pobre desarrollo psicomotor del producto, el cual, al crecer, se encuentra en los percentiles más bajos de acuerdo con la escala de Bayley.



Referencias

1. *Journal of Endocrinology*, 2000; **165**: 1-8
2. *Molecular Brain Research*, 2000; **82**: 126-132
3. *Endocrinology*, 1992; **131**(1): 195-200
4. *Endocrinology*, 1975; **97**(5): 1321-4
5. *Brain Res*, 1984; **315**(1):105-10
6. *Current Opinion in Neurobiology*, 2002; **12**: 49-56
7. *The Journal of Biological Chemistry*, 1996; **271**(19): 11055-11058
8. *The Journal of Neuroscience*, 2000; **20**(6): 2255-2265
9. *Life Sciences*, 2002; **71**: 1643-1654
10. *Journal of Neuroscience Research*, 2002; **69**: 61-71
11. *Neuroscience Letters*, 1986; **68**: 299-304
12. *The Journal of Neuroscience*, 1992; **12**(6): 2288-2302
13. *Molecular Endocrinology*, 1992; **6**: 1874-1880
14. *The Journal of Neuroscience*, 1996; **16**(24): 7832-7840
15. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 2000; **85**(7): 2620-2623
16. *Neuroscience*, 1986; **17**(1): 115-132
17. *Clinical Endocrinology*, 2000; **53**: 469-477
18. *Brain Research*, 2000; **856**: 119-128
19. *Endocrinology*, 2001; **142**(1): 390-399
20. *Neuroscience*, 2000; **101**(4): 1001-1012
21. *PNAS*, 2002; **99**(6): 3985-3989
22. *Molecular Psychiatry*, 2003; **8**: 30-38
23. *Journal of Neuroscience Research*, 2005; **82**: 851-857