



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“Estudio del mecanismo molecular de la
interferencia entre el receptor de glucocorticoides y
la señal de AMPc en el gen proTRH”

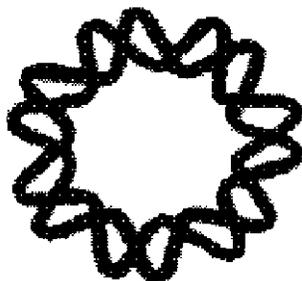
TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

LIC. ISRAIM SOTELO RIVERA

ASESOR:

DRA. PATRICIA ILEANA JOSEPH BRAVO



CUERNAVACA, MORELOS

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia, en especialmente a mis padres, Irma Rivera e Israel Sotelo por su cariño, apoyo y confianza incondicional a lo largo de estos años. A mi hermana, sobrino, abuela, tíos y primos por su afecto y hacerme olvidar de los estudios durante las vacaciones.

A mis amigos del IBT por aguantarme estos años en las fiestas, los viajes, los conciertos, las comidas, el café, las reuniones “de solo una y ya”, el rock band, los operativos y las marchas. Gracias por su amistad y confianza, porque sin ustedes esta etapa no hubiera sido igual.

A la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo por permitirme entrar al grupo y confiar en mí para la realización de este proyecto. Así como por su apoyo, amistad y enseñanzas a lo largo de estos años.

A los miembros del laboratorio por su amistad, ayuda y aprendizajes a lo largo de estos años. En especial a la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez por su ayuda en la realización de los cultivos primarios hipotalámicos. A la Quim. Fidelia Romero Arteaga por su respaldo técnico en la purificación de los plásmidos empleados. A la Dra. Mariana Gutiérrez Mariscal por la discusión del proyecto y apoyo técnico. Al Lic. Miguel Ángel Olvera Rodríguez, al QFB. Miguel Cisneros Ramírez, a Manuel Villa Herrera y a la señora Cruz Elena Martell Lugo por su apoyo técnico y logístico. A la IBI. Marcela Ramírez Yarza y a Sergio González Trujillo del bioterio-IBT por la obtención de ratas gestantes.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular a cargo de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo y se financió con los donativos DGAPA-UNAM IN-221710 y CONACyT P-83363. Durante la realización de esta tesis conté con el apoyo económico de CONACyT (beca de maestría).

*"I'm on the pursuit of happiness and I know everything that shines ain't always
gonna be gold".*

Kid Cudi - Pursuit of happiness.

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	3
Resumen en Ingles (Abstract).....	4
Introducción	5
Ejes neuroendócrinos: tiroideo y adrenal	6
Estructura y procesamiento de TRH	8
Regulación de la transcripción de TRH.	8
Antecedentes.....	13
Hipótesis.....	15
Objetivo General.....	16
Objetivos Particulares:	16
Estrategia Experimental.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Línea celular.	17
Plásmidos.	18
Purificación de plásmidos.	19
Transfección transitoria.	19
Tratamiento y cosecha.	20
Cuantificación de proteínas.	20
Actividad de luciferasa.	20
Actividad de β -galactosidasa.	21
Cultivo primario hipotalámico.	21
Anticuerpos.	23
Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).	23
Inmunoprecipitación e Inmunoblot.	24

Inmunocitoquímica.	25
Cálculos estadísticos	26
Resultados.....	27
Identificación de los sitios moleculares en el GR responsables de la interferencia al efecto estimulador del AMPc.	27
Determinar la acetilación y unión de la desacetilasa al promotor de TRH por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).	31
Evaluar si existe una interacción proteína:proteína entre GR y PKAcat.	34
Determinar la localización intracelular de GR y la activación de PKAcat por inmunocitoquímica.	38
Discusión	45
Conclusión.....	53
Perspectivas	53
Bibliografía.....	54
Anexo 1	58
Anexo 2	65

Abreviaturas

°C	Grados centígrados	DAPI	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
8Br-AMPC	8-bromo adenosina monofosfato cíclico	db-AMPC	Dibutiril- adenosina monofosfato cíclico
Ac-Lys	Acetilación de lisinas	DBD	Dominio de unión al DNA
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica o corticotropina	Dex	Dexametasona
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico	DNA	Acido desoxirribonucleico
AP1	Proteína activadora 1	ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ARC	Núcleo arcuato	Fsk	Forskolina
Arg	Arginina	FT	Factor transcripcional
BSA	Albúmina sérica bovina	Gln	Glutamina
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas	Glu	Glutamato
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina	Gly	Glicina
CO2	Dióxido de carbono	GR	Receptor de Glucocorticoides
CRE	Elemento de respuesta al AMPc	GRE	Elemento de respuesta al GR
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc	GREc	GRE compuesto
CRH	Hormona liberadora de corticotropina	GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
C-terminal	Carboxilo terminal	HDAC	Desacetilasa de histonas
		HPA	Hipotalamo-Pituitaria-Adrenal

HPT	Hipotalamo-Pituitaria-Tiroides	Pro-NH2	Prolina amidada
		proTRH	precursor del TRH
IgG	Inmunoglobulina G	PVN	Núcleo paraventricular
JNK	c-Jun N-terminal cinasa	RNA	Acido ribonucleico
kDa	Kilo Dalton	RNAm	RNA mensajero
LBD	Dominio de unión a ligando	SGK	Cinasa inducible por suero y glucocorticoides
Luc	Luciferasa	SP1	Proteína específica 1
Lys	Lisina	T3	Triiodotironina
M	Molar	T4	Tetraiodotironina o Tiroxina
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos	TH	Hormona tiroidea
NA	Noradrenalina	TPA	12-O-tetradecanoilforfol-acetato
N-terminal	Amino terminal	TR	Receptor de hormona tiroidea
PAM	Peptidil-glicil α -monooxigenasa	TRE	Elemento de respuesta a hormona tiroidea
PC	Proteína convertasa	TRH	Hormona liberadora de tirotropina
pCREB	Proteína CREB fosforilada	TSH	Hormona estimulante de la tiroides o tirotropina
PKA	Proteína cinasa dependiente de AMPc	β -Gal	Beta galactocidasa
PKAcat	subunidad catalítica de PKA		

Resumen

La activación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroides es esencial para la homeostasis energética. La expresión de TRH en el núcleo paraventricular es estimulada rápidamente por situaciones de demanda energética, pero es inhibida por un incremento en los niveles de corticosterona en situaciones de estrés. La activación de PKA por Fsk en cultivos hipotalámicos, incrementan los niveles del RNAm de TRH, efecto que se pierde al estimular conjuntamente con Dex. La interferencia de Dex al estímulo de Fsk se pierde al transfectar con mutantes de GR en el dominio DBD, la translocación nuclear y la interacción con co-reguladores, demostrando que estos sitios en GR son importantes para que se lleve a cabo la interferencia. Se evaluó por CHIP si la co-incubación de db-AMPC+Dex induce cambios en el reclutamiento de co-reguladores en el promotor de TRH (-246/+69) que ocasionen el remodelamiento de la cromatina. Al estimular con db-AMPC se observó un mayor reclutamiento de pCREB, RNAPol II y Ac-Lys, mientras que al estimular con Dex se aumenta el reclutamiento de GR. Estas señales disminuyen al co-estimular las células con db-AMPC+Dex y no se recluta a la HDAC en el promotor. Estos resultados muestran que la interferencia de los glucocorticoides con la vía de PKA no es por la condensación de la cromatina que impida que GR y pCREB se unan al promotor de TRH. Inmunoprecipitaciones de GR a partir de extractos citoplasmáticos y nucleares tratados con db-AMPC+Dex, mostraron la interacción proteína:proteína entre GR y la subunidad catalítica de PKA (PKAcát). La inmunocitoquímica de células tratadas con Fsk incrementan los niveles de pCREB en el núcleo y de GR al estimular con Dex, mientras que la co-estimulación Fsk+Dex disminuye tanto a GR, como a pCREB en el núcleo. Los resultados muestran que al estimular db-AMPC+Dex se impide la fosforilación de CREB en el núcleo y su unión al elemento de respuesta CRE, mientras que el GR no se une al sitio GRE. La asociación proteína:proteína entre GR y PKAcát podría promover un mecanismo rápido para disminuir la activación de CREB y la transcripción de TRH.

Resumen en Ingles (Abstract)

The activity of hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis is essential for energy homeostasis. TRH expression in the PVN is rapidly stimulated by energy demanding situations, but blunted by stress-induced increased corticosterone serum levels. In primary cultures of rat hypothalamic cells (RHC), PKA activators such as forskolin (Fsk) increase TRH mRNA levels, an effect reverted by coincubation with dexamethasone. Fsk-dex coincubation also impedes binding of GR and pCREB to GRE and CRE in the TRH-promoter. In an attempt to elucidate the mechanism involved, we determined whether 1h coincubation with dex or Fsk-dex induced chromatin condensation. CHIP analyses of RHC-isolated chromatin from Fsk treated cells revealed an increased PCR signal of the TRH promoter (-246/+69) in immunoprecipitates of pCREB, RNA-Pol II, Lys-Ac antibodies (Ab), and of GR from dex-treatment; these signals were diminished in Fsk-dex coincubates. No recruitment was obtained with an Ab against deacetylases in Fsk-dex compared to that detected in cells treated T3. These results demonstrate that simultaneous activation of GR and PKA does not affect chromatin remodeling, but impedes GR and pCREB binding to TRH promoter. Antibodies against the catalytic subunit of PKA (PKAcat) incubated with a GR-immunoprecipitate from subcellular fractions of RHC treated with dex-Fsk demonstrated the interaction of GR:PKAcat. In living Fsk-treated RHC, cytoimmunochemical analysis demonstrated increased pCREB in nuclei that was diminished with Fsk-Dex treatment. Furthermore, co-transfecting GR and TRH-Luc on SH-SY5Y cells reproduced the interfering effect of dex-Fsk on Fsk stimulation; dex interference on Fsk stimulation was lost when transfecting the GR mutated on DBD site (L501P), and with GR-T171A or GR-S224A mutants that affect nuclear translocation and interaction with coregulators, supporting GR intrinsic characteristics for protein:protein interactions. These results demonstrate that GR interaction with PKAcat provides a fast mechanism of Interference by dex-Fsk on Fsk stimulation of the activation of TRH transcription.

Introducción

El hipotálamo es una región situada en la base del cerebro responsable de la coordinación entre el sistema endocrino y el sistema nervioso al integrar las señales neuronales y hormonales provenientes de múltiples estímulos internos (metabólicos por ejemplo) así como ambientales. El hipotálamo regula a la glándula maestra del cuerpo, la pituitaria (o hipófisis) [1,12].

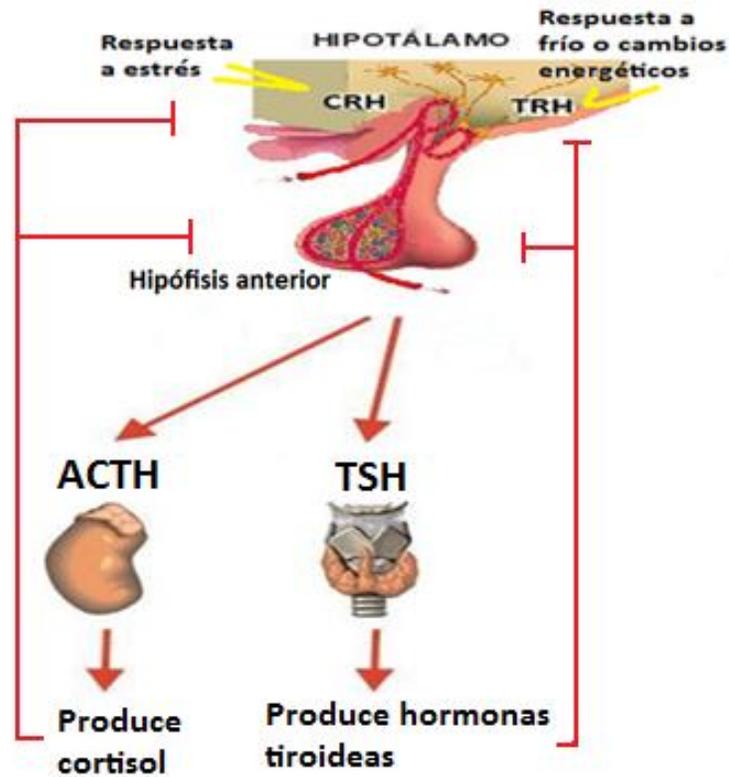
La glándula pituitaria tiene dos lóbulos: el lóbulo anterior (adenohipófisis) y el lóbulo posterior (neurohipófisis). Las hormonas son liberadas a los dos lóbulos por mecanismos diferentes. Las células neurosecretoras magnocelulares (células largas) cuyos somas se localizan en núcleos hipotalámicos proyectan directamente a la pituitaria posterior, donde se almacenan y posteriormente se liberan las hormonas peptídicas vasopresina y oxitocina. En cambio, las células neurosecretoras parvocelulares (células pequeñas) localizadas en diversos núcleos del hipotálamo secretan las hormonas a la eminencia media, donde a través del sistema de vasos capilares denominado sistema porta, las recibe la pituitaria anterior [18-20].

Dependiendo de la hormona secretada por el hipotálamo a la adenohipófisis se activan diferentes tipos celulares (somatotropo, lactotropo, corticotropo, tirotrópico y gonadotropo), estimulando la síntesis y liberación de las hormonas correspondientes (somatostatina, prolactina, corticotropina, tirotrópica y gonadotropina, respectivamente) [24,25]. Cada hormona hipofisiaria controla el funcionamiento de un órgano blanco; las hormonas liberadas por los órganos blancos ejercen un efecto de retroalimentación negativo sobre las hormonas hipotalámicas e hipofisiarias que las regulan, permitiendo así, mantener la homeostasis. El hipotálamo tiene un papel preponderante en el mantenimiento de la homeostasis, ya que decodifica las señales neuronales activadas por diferentes circuitos y las integra con las señales hormonales.

Ejes neuroendocrinos: tiroideo y adrenal

La activación de los ejes hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT), ocurre en respuesta a diferentes factores intrínsecos o extrínsecos del organismo (figura 1). El eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) se activa en respuesta al estrés. Las neuronas del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo liberan la “hormona liberadora de corticotropina” (CRH) que estimula, en la adenohipófisis, la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), también conocida como corticotropina [8]. La ACTH actúa sobre las glándulas suprarrenales que producen las hormonas glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en roedores). El aumento en el nivel basal de glucocorticoides, inhibe la síntesis de CRH y de ACTH, causando una retroalimentación negativa en su propio eje HPA [8,11].

El eje hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) tiene una función crítica en el mantenimiento del metabolismo [1,2]. La activación del eje HPT ocurre cuando las neuronas del PVN, en respuesta a distintos tipos de estímulos como el frío o cambios energéticos en el organismo, secretan la “hormona liberadora de tirotropina” (TRH) a la eminencia media donde a través del sistema porta es transportada hacia la adenohipófisis; ahí el TRH regula la síntesis y secreción de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y su liberación al torrente sanguíneo donde es transportada a su glándula blanco la tiroides. En la tiroides, TSH produce la secreción de las hormonas tiroideas (HT), tiroxina (T4) y triiodotironina (T3); T3 es la forma activa que actúa en muchos tejidos y en particular en el tejido adiposo donde participa en la termogénesis. La T3 en concentraciones elevadas inhibe la síntesis y secreción de TRH y TSH [1,2,12].



Ilustrador: Amedeu Blasco. Copyright 2004 Amedeu Blasco

Figura 1. Activación de los ejes HPT y HPA en respuesta a factores hormonales y ambientales.

Las neuronas TRHérgicas reciben señales tanto activadoras como represoras de diferentes regiones del cerebro así como del torrente sanguíneo. Las conexiones aferentes más importantes que reciben las neuronas TRHérgicas del PVN incluye el de las neuronas catecolinérgicas del tallo cerebral y de las neuronas del núcleo arcuato (ARC) del hipotálamo [12]. Los neuropéptidos del ARC median la respuesta del eje tiroideo al hambre y a situaciones de desequilibrio energético, mientras que las catecolaminas activan la expresión del gen de TRH durante la exposición al frío [9,12]. La producción de TRH no sólo ocurre en el PVN [26], sino también en otros núcleos hipotalámicos [27], en varias regiones del sistema nervioso central [28] y en células de ciertos tejidos endocrinos [15]. Sin embargo, la regulación negativa en la expresión de TRH por T3 ocurre en el PVN y en el núcleo del tracto solitario [3,29,60].

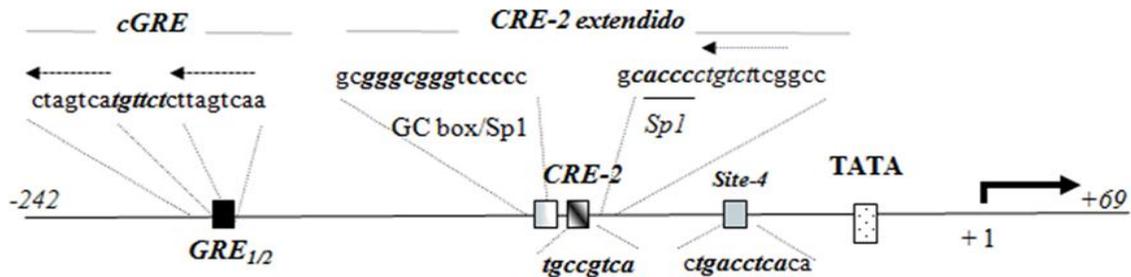
Estructura y procesamiento de TRH

El TRH es un tripéptido (pyroGlu-His-ProNH₂) que fue el primer péptido hipofisiotrópico en ser caracterizado y aislado [16,21]. Deriva de un precursor proteico (proTRH: 26 kDa) que es procesado post-traduccionalmente. En ratón y rata, el precursor contiene cinco copias de la secuencia precursora de TRH (Gln-His-Pro-Gly), mientras que en humanos hay seis [16,17,22]. Estas copias se encuentran flanqueadas por pares de aminoácidos básicos (Lys-Arg o Arg-Arg) en los extremos N-terminal y C-terminal de cada precursor [17]. El procesamiento de proTRH comienza por la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los aminoácidos básicos por las enzimas proconvertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) y por una carboxipeptidasa que escinde los aminoácidos básicos. El C-terminal de la glicina es hidrolizado por la enzima peptidil-glicina α -monooxigenasa (PAM) quedando amidada la prolina en el carbono α ; la glutamina del amino terminal es transformada por la glutaminil ciclasa en pyroGlu, generando al tripéptido biológicamente activo [23].

Regulación de la transcripción de TRH.

La región promotora del gen de TRH cuenta con elementos de respuesta para diversos factores transcripcionales (FT; figura 2). En la región -101/-94 pb del promotor, la proteína de unión a CRE (CREB) fosforilada, se une al elemento de respuesta de AMPc (CRE) [4,5]. Flanqueando el sitio CRE se encuentran elementos de respuesta para los factores de la familia Sp/Krüppel (como SP1), una secuencia rica en GC en el lado 5' y en el 3' la secuencia CACC [5]. Al elemento de respuesta a hormona tiroidea (TRE o Sitio 4) que se encuentra localizado -59/-52 pb del promotor, se une el receptor de hormona tiroidea (TR) [5]. El promotor carece de secuencias consenso del elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) pero contiene varios "medios sitios" (1/2) consenso. Se ha demostrado que el sitio GRE_{1/2} que se localiza en la región -210/-205 pb une

extractos nucleares de células estimuladas con corticosterona. Este GRE_{1/2} está flanqueado, en la cadena complementaria, por secuencias del elemento de respuesta para la proteína activadora 1 (AP1); este tipo de sitio existe en otros genes y es denominado GRE compuesto (GREc) [3,5].



Journal of Molecular Endocrinology (2005) 34, 177-197.

Figura 2. Elementos de respuesta en el promotor de TRH (de rata).

La regulación neuronal de TRH ocurre en respuesta a un estímulo como por ejemplo, el frío que estimula neuronas de la médula espinal y liberan noradrenalina (NA) en el PVN. La activación de las neuronas TRHérgicas causa la liberación inmediata de TRH en la eminencia media y, concomitantemente, un incremento rápido y transitorio del RNAm de proTRH [9]. A los pocos minutos que se libera el TRH, se libera la TSH y aumentan los niveles de HT en sangre pero además, de glucocorticoides. Los glucocorticoides liberados en respuesta al estrés regulan negativamente al eje tiroideo [31] y la expresión del gen de TRH en el hipotálamo [3,7].

Estudios *in vitro*, donde se utilizaron cultivos primarios de células hipotalámicas fetales de rata, mostraron que la incubación de NA incrementa rápidamente los niveles del RNAm de TRH [30]. En la figura 3 se muestra la vía de señalización activada por NA, un modulador hidrofílico, que interactúa en la membrana y se une a su receptor membranal acoplado a proteína G que activa a segundos mensajeros, entre ellos a la enzima adenilato ciclasa que incrementa los niveles intracelulares de AMPc. El aumento de AMPc conduce a la activación de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA) causando la disociación y

translocación nuclear de su subunidad catalítica (PKAcat). En el núcleo, la PKAcat fosforila rápidamente al factor transcripcional CREB haciendo que se una al sitio CRE en el promotor activando la transcripción [5,9]. La incubación de células hipotalámicas con análogos permeables de AMPc y forskolina mimifica la respuesta de NA [3].

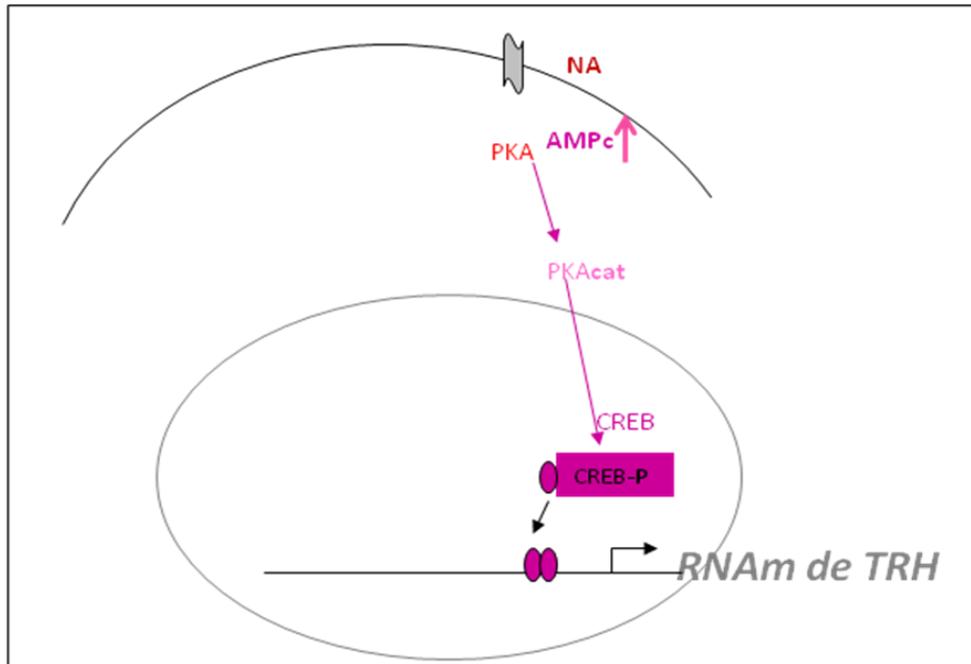


Figura 3. La activación de CREB a través de la vía de señalización de noradrenalina.

La regulación de TRH por los glucocorticoides está mediada por el receptor de glucocorticoides II (GR) que pertenece a la familia de receptores nucleares hormonales [31]. El GR cuenta con un dominio central que contiene dos dedos de zinc, responsables de la unión al DNA (DBD). El dominio C-terminal de unión a ligando (LBD) es el responsable de la unión de glucocorticoides y cuenta con regiones de unión para las proteínas de heat shock. El LBD sobrelapa con el dominio de activación 2, el cual se expone una vez que se realiza el cambio conformacional inducido por la unión del ligando. El dominio N-terminal contiene al dominio de activación 1 que no requiere la unión de ligando para su activación; así

como sitios importantes de fosforilación que median su localización celular y su interacción con co-reguladores [8].

Los glucocorticoides al hacer lipofílicos son capaces de atravesar la membrana e interactuar con el GR en citosol (figura 4), el cual se encuentra formando un complejo proteico con proteínas de heat shock. La unión del ligando induce un cambio conformacional en el GR provocando su disociación del complejo, así como su fosforilación en múltiples sitios. El cambio conformacional del GR expone la secuencia de translocación nuclear permitiendo su entrada al núcleo. Una vez en el núcleo, el GR activado puede unirse al sitio GRE y activar o reprimir la transcripción génica [8]. El GR puede interactuar con otros FTs de manera dependiente o independiente de su unión al DNA, formando heterodímeros del tipo GR:c-Jun que se unen al sitio GRE en el promotor ó al unirse con FTs como AP1 unidos previamente al DNA, respectivamente. Diversos estudios muestran que algunas de las interacciones de GR con los diferentes FTs ocurren a través del bucle-D dentro del dominio DBD. Las mutantes de GR en la región DBD pierden la capacidad de interactuar con AP1 y NF- κ B para reprimirlos o activarlos como ocurre con Oct-1/2 [8].

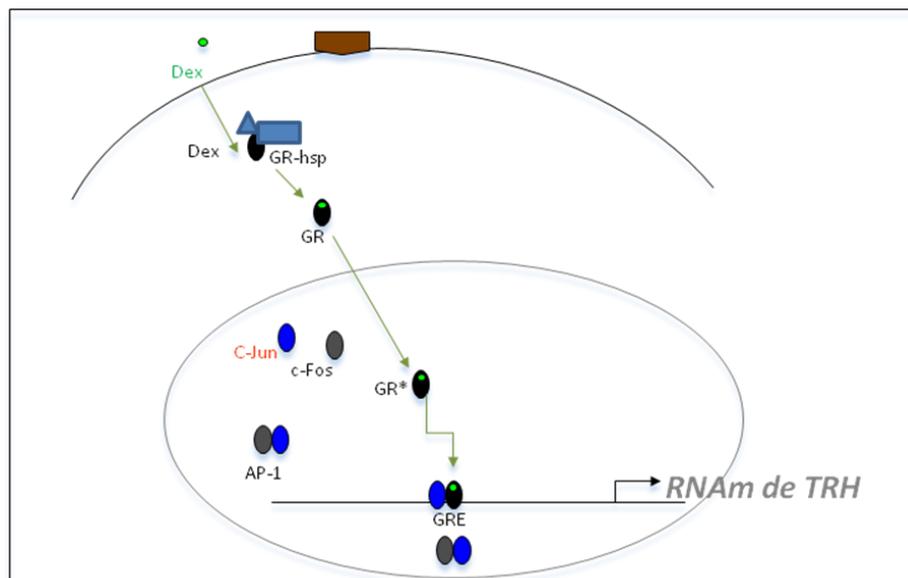


Figura 4. La regulación transcripcional del gen de TRH por dexametasona (Dex; análogo sintético de glucocorticoides).

Las unidades básicas de la cromatina son los nucleosomas. Éstos se encuentran formados por aproximadamente 147 pares de bases de longitud de DNA, asociados a un complejo de 8 histonas. Las distintas histonas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales, como la metilación, acetilación, fosforilación, generalmente dada en residuos de lisina o arginina. La acetilación está asociada con activación de la transcripción, ya que al acetilarse una lisina, disminuye la carga positiva global de la histona por lo cual tiene una menor afinidad por el DNA (que está cargado negativamente). Por el contrario, la metilación o la desacetilación están asociadas con la represión transcripcional y una unión DNA-histona más fuerte [66].

El GR, al igual que los otros receptores nucleares hormonales, es capaz de interactuar con diferentes co-reguladores para mediar la activación o represión de la transcripción [32]. En la activación transcripcional, el GR recluta co-activadores como los complejos remodeladores de la cromatina dependientes de ATP (SWI/SNF), acetiltransferasas de histonas (HAT), así como los miembros de la familia p160 (co-activadores de receptores esteroideos (SRC)-1,2 y 3), la proteína de unión a CREB (CBP) y p300, esenciales para modificar la arquitectura de la cromatina del promotor y permitir el reclutamiento subsecuente de FTs adicionales, así como los miembros de la maquinaria basal de transcripción. La represión transcripcional mediada por GR ocurre a través del reclutamiento de co-represores como las desacetilasas de histonas (HDAC), los co-represores de receptores nucleares (NCoR) y el complejo mediador de silenciamiento del receptor retinoico y hormona tiroidea (SMRT), los cuales son capaces de reclutar las HDAC 1, 2 y 3 [32,33]. Estos y otros co-reguladores median modificaciones post-traduccionales en las histonas, tales como la acetilación, fosforilación, metilación y ubiquitinación alterando la interacción entre histonas y el DNA produciendo cambios en la estructura de la cromatina [32].

Antecedentes

Los efectos de los glucocorticoides sobre la transcripción de TRH dependen de la dosis y el tiempo, así como del modelo experimental. Los experimentos *in vivo* con ratas adrenalectomizadas, donde aumenta la expresión de TRH, la administración de Dex causa una reducción en la transcripción del gen de TRH en el PVN; en cambio *in vitro*, los niveles del RNAm de TRH se incrementan al estimular un cultivo primario de células hipotalámicas con Dex por 1h, con dosis de hasta 10^{-8} M, siendo que dosis superiores causan inhibición [7]. El incremento en los niveles del RNAm de TRH al estimular con Dex es de menor magnitud que los obtenidos al incubar las células con análogos permeables de AMPc (db-AMPc o 8Br-AMPc) o forskolina; en cambio, al combinar los tratamientos de Dex y 8Br-AMPc se elimina la activación del RNAm de TRH (figura 5) [3,7]. Sin embargo, esta disminución del RNAm depende del tiempo, ya que no se observa cuando se preincuba por 10 minutos con Dex y luego se añade NA, pero al invertir el orden, 10 minutos con NA seguido por la adición de Dex el efecto estimulador disminuye [3].

Journal of Neuroendocrinology, 22, 282–293

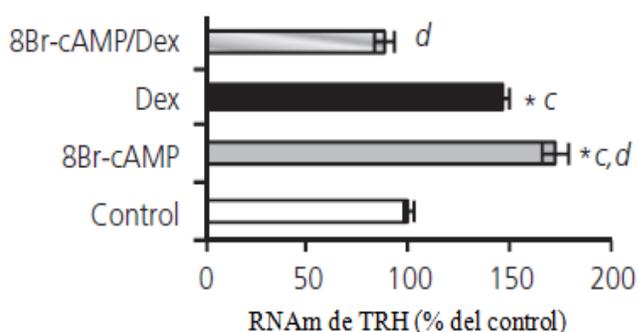


Figura 5. Niveles del RNAm de TRH en células hipotalámicas tratadas por 1 hora con 1 mM de 8Br-cAMP, 10 nM de Dex, solos o combinados. Los valores presentados son la media del cDNA de TRH/cDNA de ciclofilina, calculados como un porcentaje del control (=100%) \pm el error. Prueba post hoc Fisher's LSD: * $p < 0.005$ contra el control; grupos con la misma letra (c o d), $p < 0.01$ entre ambos grupos.

Trabajos previos del laboratorio, mostraron con ensayos de "footprinting" en los sitios CRE y GREc del promotor de TRH, que extractos nucleares de células hipotalámicas estimuladas con 8Br-AMPc generan un área de protección extendida de 10-18 pb a cada lado del sitio CRE. Al analizar el sitio GREc con

extractos nucleares estimulados con Dex se encontró una protección en el sitio GRE_{1/2}, mientras las secuencias AP1 fueron protegidas al utilizar los extractos nucleares de células estimuladas con 8Br-AMPC o TPA. La protección de cualquiera de los sitios CRE o GREc se pierde cuando se estimula conjuntamente 8Br-AMPC+Dex [4,5].

Extractos de células estimuladas con 8Br-AMPC+Dex no muestran la unión de GR ó pCREB a sus respectivos elementos de respuesta en la región reguladora [3,5]. Ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) mostraron que no sólo se pierde la unión de GR al GREc y pCREB al CRE sino también la unión de SP1 a la región extendida de CRE en la secuencia rica en GC [5], encontrando que sólo c-Fos y c-Jun permanecen unidos al promotor de TRH al estimarse con 8Br-AMPC+Dex.

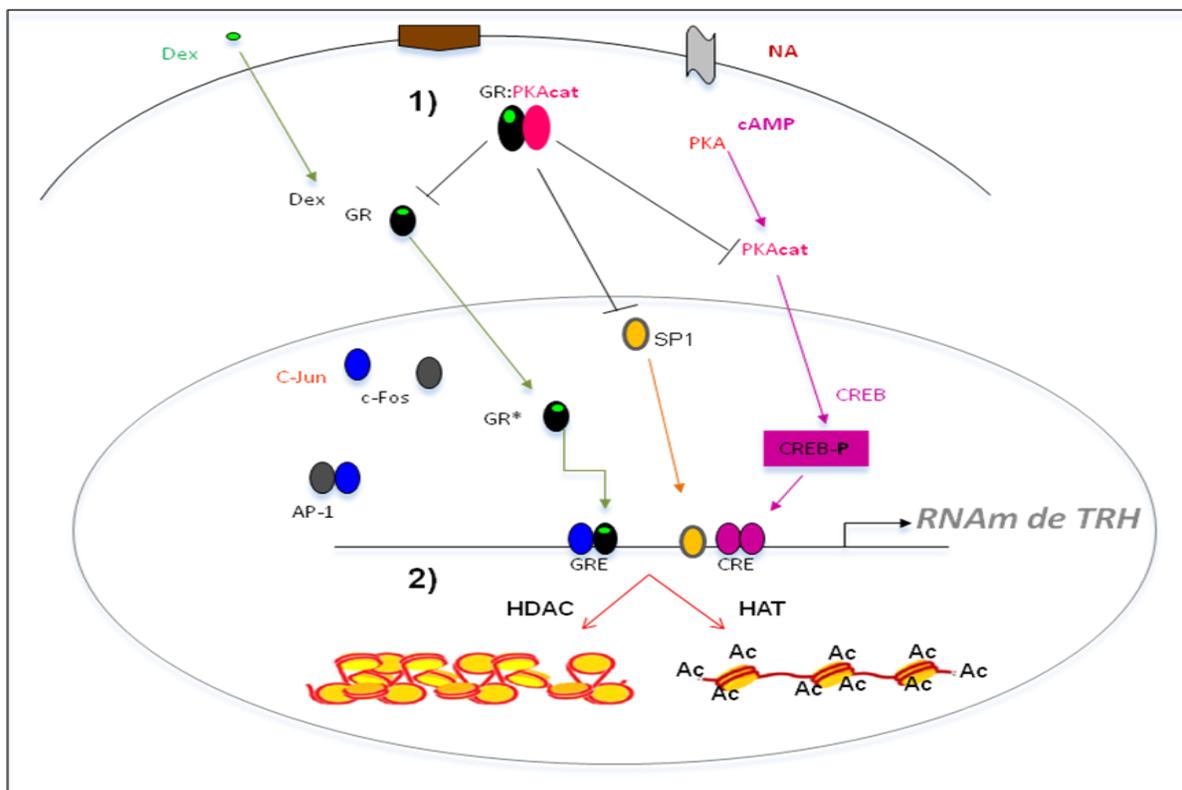
Se han descrito interacciones proteína:proteína de GR con pCREB [57] ó con PKAcat [6]. Si bien se reportó que por co-inmunoprecipitación se podía precipitar el complejo GR:pCREB, esto no fue observado utilizando extractos de células hipotalámicas incubadas con db-AMPC+Dex (A. Cote, no publicado). La unión GR:PKAcat se ha postulado en sistemas inmunes [6] y en el caso de la regulación transcripcional de CRH [14,35]. Neuronas CRHérgicas del PVN de animales tratados con glucocorticoides muestran inhibición de la fosforilación de CREB, siendo un posible mecanismo para la inhibición de la biosíntesis de CRH por los glucocorticoides [14]. La interacción con PKAcat se demostró en la línea celular de neuroblastoma BE(2)C, que expresa CRH, donde la inhibición por glucocorticoides se suprime al aumentar la expresión de PKAcat, mientras que al ir aumentando GR la inhibición regresa [35]. Este tipo de co-transfecciones en las que un factor en exceso desenmascara la inhibición apoya una posible interacción entre GR y PKAcat en células neuronales.

Hipótesis

El receptor de glucocorticoides inhibe la expresión del TRH mediada por AMPc a través de un mecanismo independiente de su unión al DNA.

Postulando el siguiente modelo:

- 1) Una interacción directa entre GR activado y PKAcat, que evita la unión de CREB y de GR al DNA.
- 2) La falta de unión de los FTs al promotor de TRH, afecta el estado de la cromatina.



Objetivo General

Elucidar el mecanismo de interferencia de los glucocorticoides a la señalización mediada por AMPc en la expresión del gen de la hormona liberadora de tirotrópina.

Objetivos Particulares:

- A. Identificar los sitios de GR que pudieran estar involucrados en la interferencia a la señal del AMPc.
- B. Evaluar el estado de la cromatina en el locus del promotor de TRH en respuesta a la activación de PKA, GR y combinados.
- C. Determinar si existe una interacción proteína:proteína entre GR y PKAc_{at}, responsable de la interferencia en la señalización del AMPc.

Estrategia Experimental

- A. Determinar sitios involucrados en la interferencia empleando mutantes de GR en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y por transfección con lipofectamina 2000, al estimular las células con Dex, db-AMPc y combinados.
- B. Determinar la unión de desacetilasas y la acetilación de lisinas en comparación con la unión de la RNA polimerasa II, pCREB y GR al promotor de TRH por CHIP en cultivos primarios hipotalámicos, estimulando por 1 hora con Dex, db-AMPc, db-AMPc+Dex y T3; la incubación con T3 se

utiliza como control de la unión de desacetilasas [10]. Se inmunoprecipitará la cromatina de células estimuladas utilizando los anticuerpos contra L-Ac, HDAC3, RNAPol II, GR, pCREB e IgG. El promotor de TRH se identificará mediante PCR semicuantitativa, utilizando los oligonucleótidos que abarcan el sitio GREc, CRE/CRE extendido y el TRE.

- C. Estudiar la interacción GR:PKAcát por co-inmunoprecipitación e inmunoblot en cultivos primarios hipotalámicos estimulando por 1 hora con Dex, db-AMPC y combinados.
- D. Determinar la localización intracelular de GR y la activación de PKAcát por inmunocitoquímica en cultivos primarios de hipotálamo estimulados por 45 minutos con Dex, forskolina y combinados.

Materiales y Métodos

Línea celular.

Células de la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) se cultivaron en placas de 100 mm (p100) en medio DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Medium) suplementado (DMEM-S) con suero fetal bovino al 10 %, glucosa al 0.25 %, glutamina al 2 mM, insulina a 3.3 µg/ml, mezcla de antibiótico-antimicótico al 1 % (50 unidades/ml penicilina G, 50 µg/ml sulfato de estreptomicina y 0.125 µg/ml amfotericina B como fungicida) y mezcla de vitaminas al 1 %; esterilizado por filtración a 0.22 µm. El medio se sustituye cuando empieza a acidificarse tomando un color naranja-amarillento (aproximadamente cada 2 días). Las células se incuban a 37 °C y 5 % CO₂ hasta obtener confluencia del 90-95 % aproximadamente.

Las células se cosechan retirando primero el medio de incubación del frasco y agregando tripsina-EDTA templada, incubando 5 min a 37 °C. Las células desprendidas se recuperan utilizando una pipeta Pasteur, colocándolas en un tubo cónico de 15 ml que contiene medio fresco para inactivar la tripsina y se centrifugan durante 5 min a 2500 rpm a temperatura ambiente (TA). Las células se resuspenden en DMEM-S y se siembran en placas de 24 pozos previamente recubiertas con una capa de poli-D-lisina, aplicada durante 2 horas mínimo a 37 °C. Se utiliza una densidad celular de 2×10^5 células/pozo, manteniéndose en incubación a 37 °C y 5 % CO₂. Las células se diferencian por 8 días con TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) a una concentración de 16 nM y medio DMEM-S 5 % SFB, haciéndose cambio de medio cada dos días.

Plásmidos.

El plásmido reportero pNASS-TRH-luc permite la expresión de la luciferasa bajo el control del promotor de TRH (donado por Dr. Balkan; Geriatric Research, Education, and Clinical Center, USA) y el plásmido reportero RSV-βGal (donado por Dra. Susana Castro; Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, MEX) permite la expresión de la β-galactosidasa bajo el control del promotor del virus del sarcoma de Rous, utilizado como control interno de transfección. Se utilizó el plásmido acarreador puc18 para completar la cantidad requerida de DNA (800 ng) para las transfecciones (donado por Dr. Yamamoto; University of California, San Francisco, USA). El plásmido de expresión p6RGR-wt (GR-wt) expresa al GR silvestre de rata (donados por Dr. Albert; Neuroscience Research Institute, University of Ottawa, CAN). Las mutantes en el dominio N-terminal del receptor de glucocorticoides de rata p6RGR-T171A (con la mutación en la treonina 171 por una alanina, GR-T171A) y p6RGR-S224A (mutado en la serina 224 por una alanina, GR-S224) caen fuera del DBD y son sitios importantes de fosforilación involucrados en la translocalización y co-activación del receptor (donados por Dr. Yamamoto; University of California, San

Francisco, USA). El plásmido p6RGR-L501P (GR-L501P) expresa al receptor de glucocorticoides de rata con un cambio de leucina por prolina en la posición 501 de la secuencia lineal de aminoácidos, modificando al segundo dedo de zinc, lo cual daña el dominio de unión a DNA y su dimerización con otros factores transcripcionales (donado por Dr. Albert; Neuroscience Research Institute, University of Ottawa, CAN). El p6RGR-triple (GR-tm) expresa al receptor de glucocorticoides con una triple mutación en los sitios T171A/S224A/S246A presentes en el dominio N-terminal, estas mutaciones caen fuera del dominio de unión a DNA y son sitios importantes de fosforilación involucrados en la translocalización y co-activación del receptor (donado por Dr. Yamamoto; University of California, San Francisco, USA). *[nota: GR-L501P y GR-tm se evaluaron en el trabajo de tesis de licenciatura pero se incluyen los datos como apoyo a los actuales]*.

Purificación de plásmidos.

La purificación se realizó en columnas Qiagen de 100 utilizando el protocolo del fabricante (Plasmid Purification Handbook, Very Low-Copy Plasmid/Cosmid Purification). Se transformaron células de la cepa DH5 α de E. Coli con cada uno de los plásmidos. Los vectores se resuspenden en agua mQ y se almacenan hasta su uso a -20 °C.

Transfección transitoria.

Las células SH-SY5Y (sembradas en placas de 24 pozos y diferenciadas durante 8 días en medio DMEM-S con 5 % SFB en presencia de TPA) se prepararon para la transfección al sustituirles el medio por DMEM-S sin antibiótico al 5 % SFB. Al día siguiente, el medio se sustituyó por medio DMEM/Glucosa mientras se prepara la lipofectamina 2000 para la co-transfección de las células, siguiendo las

especificaciones del fabricante (Invitrogen Corp. Cat. No. 11668-027). Después de la transfección las células se cultivaron durante 48 horas en medio DMEM-S.

Tratamiento y cosecha.

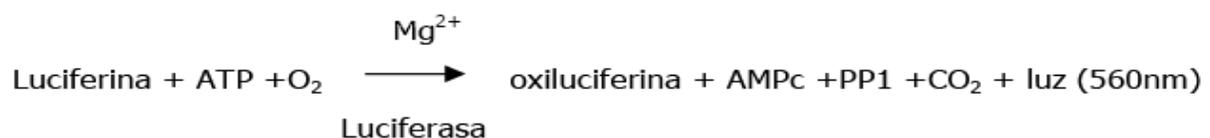
Cuarenta y ocho horas después de la transfección se reemplaza la mitad del medio con DMEM-S sin SFB conteniendo las drogas db-AMPC (a una concentración de 1×10^{-3} M), Dex (1×10^{-8} M) o ambas. Las células se incubaron con las drogas durante 4 horas aproximadamente para garantizar la síntesis de la luciferasa o de la β -galactosidasa. Transcurrido el tiempo de la incubación las células se lavaron con PBS 1X frío y se agrega el buffer de lisis 1X. La células se remueven con el embolo de una jeringa y se recuperan en un tubo de 1.5 ml. Los tubos se centrifugan a 12,000 g durante dos minutos a 4 °C, el sobrenadante se recupera haciéndose alícuotas las cuales se almacenan a -70°C hasta su uso.

Cuantificación de proteínas.

La cantidad de proteína de cada lisado se determina con el método descrito de Bradford [64]. Se realiza una curva estándar con concentraciones ascendentes a partir de un stock de 0.2 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) mezclando un volumen constante de reactivo de Bradford, se determina la absorbancia a 595 nm. Los valores expresados en unidades de concentración (mg/ml) de la curva estándar se utilizan para interpolar las concentraciones de las muestras.

Actividad de luciferasa.

La enzima luciferasa cataliza la reacción:



El exceso de ATP en una solución que contenga los otros reactivos y la enzima bajo condiciones estándar produce una intensidad de luz que es proporcional a la actividad de la luciferasa. Para medir la actividad de luciferasa se utiliza un Luminómetro (Analytical Luminescence Laboratory Monolight 2010).

Actividad de β -galactosidasa.

El ensayo de β -galactosidasa se realiza en presencia de una solución con: 100X de Mg, 1X ONPG (O-nitrofenil- β -galactopiranosida), fosfato de sodio 0.1M pH 7.5 y extracto celular llevado a 30 μ l con buffer de lisis 1X. La reacción se incuba a 37 °C hasta la aparición del color amarillo característico. La densidad óptica se mide a 405 nm en un lector de Elisa. El color se produce cuando en la reacción el ONPG es hidrolizado por la β -galactosidasa a ONP (O-nitrofenol).

Cultivo primario hipotalámico.

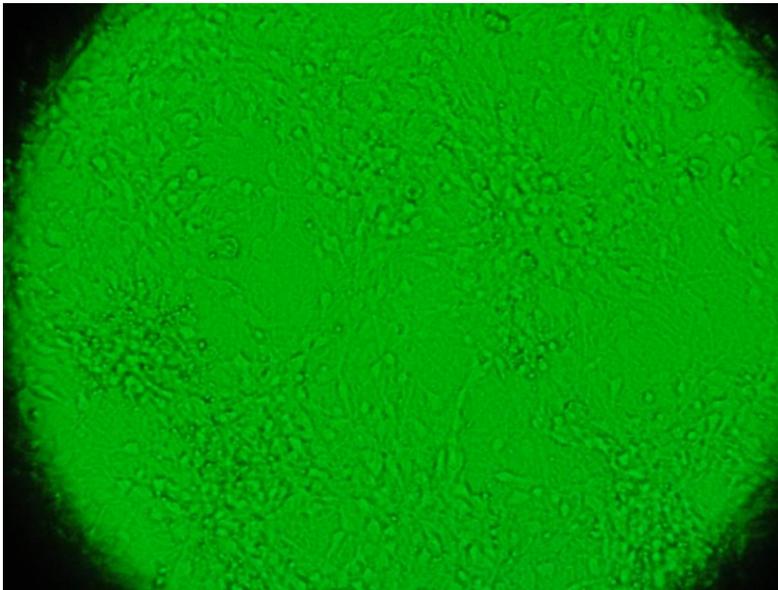
Para realizar el cultivo primario se utilizan embriones de rata de 17 días de gestación como se describe en [62]. Se inyecta a las rata gestante una dosis letal de pentobarbital sódico (350 μ l); una vez dormida la rata, se sacan los embriones uno a uno y se extrae el hipotálamo colocándolo en solución de Hank's a 37 °C (Los hipotálamos fueron extraídos por la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez; IBt, UNAM). Una vez colectado el tejido se dispersa primero con enzimas (DNAsa + tripsina y DNAsa tipo I) y posteriormente de manera mecánica utilizando pipetas Pasteur con aberturas de diferente diámetros. Para la siembra se utilizan cajas petri de 60 mm (p60) previamente tratadas con poli-D-lisina, colocando aproximadamente 5×10^6 células/p60 en 4.5 ml de medio DMEM-S.

Al cuarto día se agrega Citosina Arabinósida (AraC) 10 μ M por 48 hr para detener la reproducción de células glía presentes en el cultivo. Al sexto día se efectúa el cambio parcial de medio, extrayendo 2 ml y reemplazarlo por 2.5 ml de DMEM-S. El cultivo se continúa por 18 días en una incubadora (Napco Model 5100, Thermo

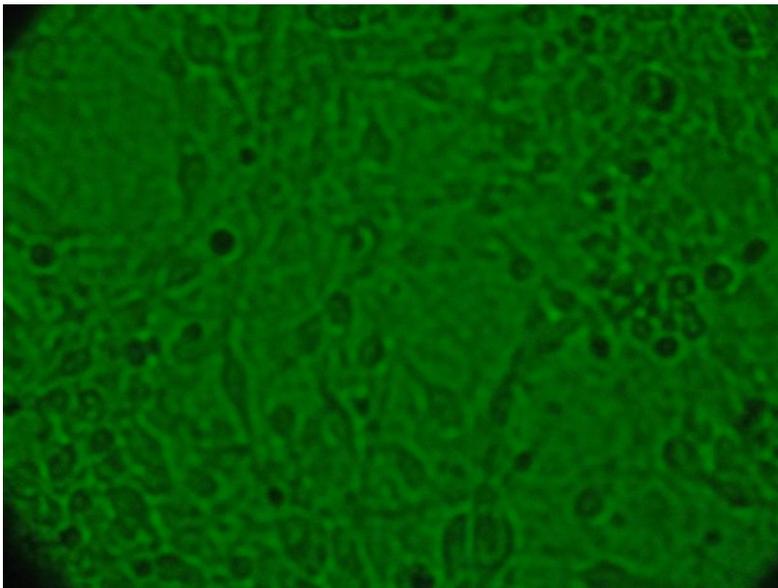
Scientific y Revco Ultima) con 5 % de CO₂ y a 37 °C con cambio de medio cada dos días. Al día 18 *in vitro* (DIV18), las células del cultivo primario hipotalámico se estimularon 1 hr con db-AMPC [1x10⁻³ M], Dex [1x10⁻⁸ M], db-AMPC+Dex y T3 [1x10⁻⁸ M]. Hubo diferencias en el tratamiento de las células sólo para la técnica de inmunocitoquímica (se describe en la sección correspondiente).

Se muestran fotos de un cultivo primario hipotalámico de 16 días, utilizando el microscopio Nikon DIAPHOT 300 y la cámara SONY DSC-HX1 cyber-short:

Objetivo 10X



Objetivo 20X



Anticuerpos.

Los anticuerpos utilizados provienen de *Santa Cruz Biotechnology, Inc*: Ac-Lys, acetilación de lisina (Ak-4): sc-32852, HDAC3 H99, desacetilasa 3 (aminoácidos entre 330-428): sc-11417, GR (H-300): sc-8992, PKA $\alpha/\beta/\gamma$ cat (H-95): sc-28892, pCREB-1 (S-133): sc-7978. *Ab Covance*: RNA polymerase II H14 (reclutada en el promotor). *Active Motif*: Chromeo 488 Goat anti-Rabbit IgG y Chromeo 546 Goat anti-Rabbit IgG.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

Se siguió el método descrito [4,5]. Después de 1h de incubación de las células hipotalámicas (18DIV) con T3, db-AMPC y/o Dex, se agrega una solución de formaldehído al 1% del total de volumen para el entre cruzamiento durante 10 min, seguido de una solución de glicina a una concentración final de 125 mM para detener el entre cruzamiento por 5 min; se lavan las células 2 veces con PBS 1X y se agrega el buffer de lisis. Las muestras se sonicán con 30 pulsos de 20 segundos para obtener fragmentos de aproximadamente 300 pb. Para la inmunoprecipitación, se agregan 4 μ g del anticuerpo, incubando toda la noche en agitación constante a 4 °C. Al día siguiente se agrega la proteína A/G sefarosa (sc-2003, Santa Cruz Biotechnology) y se incuba durante 4 horas en agitación constante a 4 °C. Posteriormente se centrifuga la suspensión conteniendo el inmunoprecipitado, los complejos proteína-DNA. Se recuperan las esferas y se lavan (1 ml) con cuatro diferentes buffers de paro (I, II, III, TE (2 veces) y lavado de perlas), centrifugando en cada lavada. Después se revierte el entre cruzamiento para liberar el DNA por calor (65 °C, toda la noche). Finalmente las secuencias específicas de DNA inmunoprecipitadas son amplificadas por PCR semicuantitativa utilizando oligonucleótidos que abarcan la secuencia -242/+69 del promotor de TRH conteniendo los sitios GREc, CRE/CRE extendido y el sitio 4 (oligo 3: 5'-ACG TCT CTC CCT CCC TTT GT-3' y el oligo 4: 5'-TTT GCA ATA

CTC CCG AAT CC-3'). El programa de PCR: 2 min a 94 °C, seguido por 32 ciclos de 45 seg a 94 °C, 30 seg a 61 °C y 1 min a 72 °C; con una extensión final de 25 min a 68 °C.

Ciclos: 30, 31, **32**, 33, 34, 35



Cuantificación: 11.9, 16.5, 17.7, 18.5, 22.3, 23.1

La intensidad de las bandas se cuantificó con el software Quantity One 4.2.1 (Bio-rad). Los datos del ChIP fueron normalizados utilizando los valores del input (control positivo) y se eliminó la señal de fondo utilizando un porcentaje de los valores de perlas e IgG (control negativo). Los resultados representan el aumento o la disminución en el reclutamiento en el promotor del gen de TRH, al compararse contra los valores obtenidos del control (sin estímulo) siendo estos el 100%.

Inmunoprecipitación e Inmunoblot.

Para la realización de la inmunoprecipitación se siguió lo descrito en [63]. Las células incubadas con db-AMPC y/o Dex por 1h se lavan una vez con PBS 1X y se resuspenden con PBS 1X en un tubo cónico de 15 ml, centrifugando por 7 min a 3500 rpm. Se lisan las células utilizando un buffer hipotónico para recuperar la fracción citoplasmática y un buffer hipertónico para obtener la fracción nuclear. La concentración de proteína se determina por el método de Bradford, colocando 500 µg de proteína de las diferentes condiciones experimentales en un tubo de 1.5 ml, llevando a un volumen final de 500 µl con los buffer hipo o hipertónico para obtener una solución isotónica. Se agregan 2 µg de anticuerpo (anti-PKAcet o anti-GR) y se incubó toda la noche a 4 °C en agitación suave. Al día siguiente se agrega 25-30 µl de esferas conteniendo la proteína A/G seferosa y se mantienen a 4 °C por cuatro horas en agitación.

Posteriormente las esferas se lavan dos veces con el buffer isotónico, centrifugando a 3000 rpm por dos minutos a 4 °C. Se elimina lo más posible de buffer, sin dejar secas las esferas, se agrega el "sample buffer" 1X y se hierven durante 7 min. Se prepara el gel a 10% Tris/Glicina SDS-Poliacrilamida en función del peso molecular de las proteínas que se van a resolver. Las muestras se colocan en el gel y se corren en buffer de corrida 1X durante 1 hora y cuarto a un voltaje constante de 100 voltios.

Una vez separadas por SDS-PAGE, las proteínas pueden ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa, a 100 voltios por 75 min en buffer de transferencia. De esta manera las proteínas quedan adheridas en la membrana en la misma posición y orden que ocupaban en el gel de acrilamida. La membrana obtenida se recorta en dos partes para identificar a GR (95 kDa) y PKAcat (40 kDa), la parte superior con pesos moleculares mayores a 50 kDa y la parte inferior menores a 50 kDa. Se bloquean las membranas con leche descremada al 6% durante 1 hora en agitación. La presencia de proteínas se revela con el anticuerpo primario específico de la proteína de interés en agitación a 4 °C toda la noche. Se lavan las membranas 3 veces de 7 min con 10 ml leche descremada al 1%, seguido de 3 lavados de 7 min con 10 ml de TBS al 1%. Se incuban con el anticuerpo secundario conjugado con proteína A por 75 min en agitación, se repiten los 3 lavados con leche descremada al 1% y los 3 con TBS 1% por 7 min cada uno. Finalmente, se revelan las membranas con el sustrato quimioluminiscente y se expone a una película autorradiográfica.

Inmunocitoquímica.

Para realizar la detección por inmunocitoquímica se siguió el método descrito en [65]. Las células de hipotálamo de embriones de rata fueron colocadas a una densidad de 1.3 millones de células en cajas Chamber Slide (2 well glass slice). Al término de los 18 días, se estimulan las células por 45 min con db-AMPC [1x10⁻³ M], Dex [1x10⁻⁸ M] o db-AMPC+Dex. Se lavan dos veces las cajas con PBS y se

fijan las células con paraformaldehído a 4% por 10 min a 4 °C, se permeabilizan las células con 200 µl de triton X-100 al 1% en PBS durante 5 min, después se lavan 2 veces con PBS. Se incuban con solución de bloqueo (suero 10% y triton X-100 al 1% en PBS) durante 30 min, seguido por el anticuerpo primario (GR 1:500 y PKAcat 1:500) en cámara húmeda a 4 °C toda la noche. Se lavan con PBS 3 veces y se incuban con el anticuerpo secundario 1:1500 Chromeo 488 (para GR y pCREB) y Chromeo 546 (para PKAcat) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan 3 veces con PBS y se tiñen los núcleos con DAPI por 1 minuto a 1:5000 (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, D9542- Sigma). Se lavan las células una vez con PBS 1X y se agrega unas gotas de solución de montaje (Crystal Mount Aqueous Mounting Medium, Sigma). Se utilizó el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioskop, Alemania) con el objetivo 20X, usando filtros para DAPI, Rodamina y Fluoresceina. Las imágenes se capturaron con la cámara Sony DXC390P, usando el programa Morpho Explora Nova. Los tiempos de exposición para el anticuerpo secundario Chromeo 488 fue de 40 frames (1.6 seg) para anti-pCREB y 70 frames (2.8 seg) para anti-GR, para el anticuerpo secundario Chromeo 546 fue de 90 frames (3.6 seg) para PKAcat. Se realizó el merge de las imágenes en Adobe Photoshop CS3.

Cálculos estadísticos

En cada cultivo se normalizaron los valores de los controles al 100% y las diferencias de los valores experimentales se calcularon contra los controles. Los valores en porcentaje, correspondientes a los distintos experimentos, se analizaron por análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el programa SPSS 13.0 para Windows para realizar el método de análisis de ANOVA de una vía y si la $p < 0.05$, se realizó la prueba de post hoc Tukey's HSD.

Resultados

Identificación de los sitios moleculares en el GR responsables de la interferencia al efecto estimulador del AMPc.

Para lograr este objetivo se realizaron transfecciones transitorias de las células SH-SY5Y con plásmidos conteniendo el GR silvestre ó mutado (mutaciones descritas en la figura 6) junto con el gen reportero TRH-luc y β -gal. Las células fueron estimulas por 4 hr con Dex, db-AMPc y combinados.

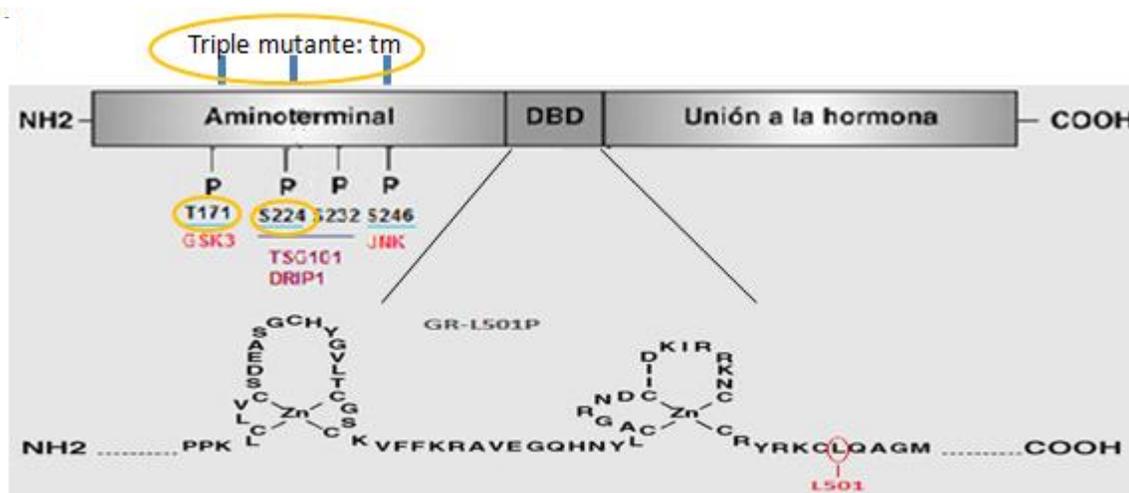


Figura 6. Estructura del receptor de glucocorticoides donde se muestran los sitios que se encuentran mutados en los plásmidos de GR utilizados y que son sitios de fosforilación por las enzimas señaladas al calce. Abreviaciones: GSK3, cinasa glucógeno sintasa 3; JNK, cinasa de Jun; los otros sitios son importantes en la interacción intermolecular con co-reguladores como DRIP1 y TSG101.

Las células transfectadas con el GR-wt muestran una activación del gen reportero al estimular con db-AMPc, tendencia no significativa con Dex y valores similares al control al estimular con db-AMPc+Dex (figuras 7 y 8); estos datos reproducen la interferencia de los glucocorticoides en la vía del AMPc observada en el RNAm de proTRH [3,7].

Transfecciones con la mutante GR-L501P indujeron la actividad del reportero al incubar con db-AMPC pero también con db-AMPC+Dex. En cambio, la mutante GR-tm muestra una respuesta estimuladora de Dex y sólo levemente disminuida con db-AMPC+Dex [13]. [El estudio de las mutantes de GR: GR-L501P y GR-tm (figura 7), reportado en la tesis de licenciatura [13] se incluye para evaluar el trabajo en su conjunto].

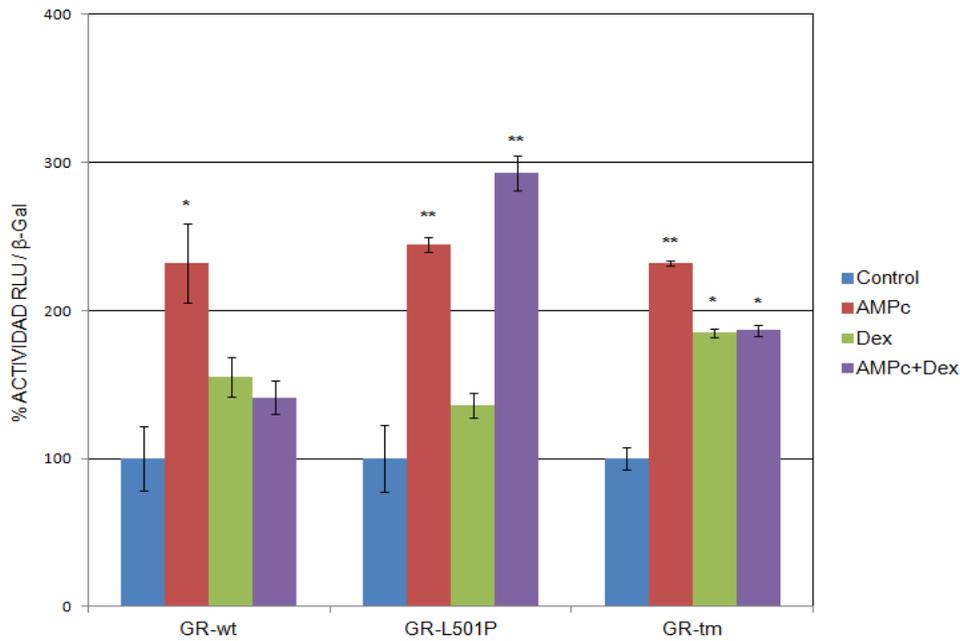


Figura 7. Efecto de GR-wt, GR-L501P y GR-tm sobre la actividad del gen reportero TRH-luc. Las células fueron estimuladas por 4 horas con AMPC [1×10^{-3} M] y Dex [1×10^{-8} M] solos o combinados. Los valores se muestran en porcentajes del control \pm el error, siendo el 100 % los resultados sin estímulo (control). Tukey's HSD post hoc: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$ vs control.

Similar a lo observado con la mutante GR-L501P, la transfección con el GR-T171A permite un aumento en la actividad del reportero al estimular con db-AMPC+Dex de la misma magnitud que la obtenida con sólo db-AMPC (figura 8), indicando que la mutante GR-T171A no interfiere con la señalización de la vía del AMPC.

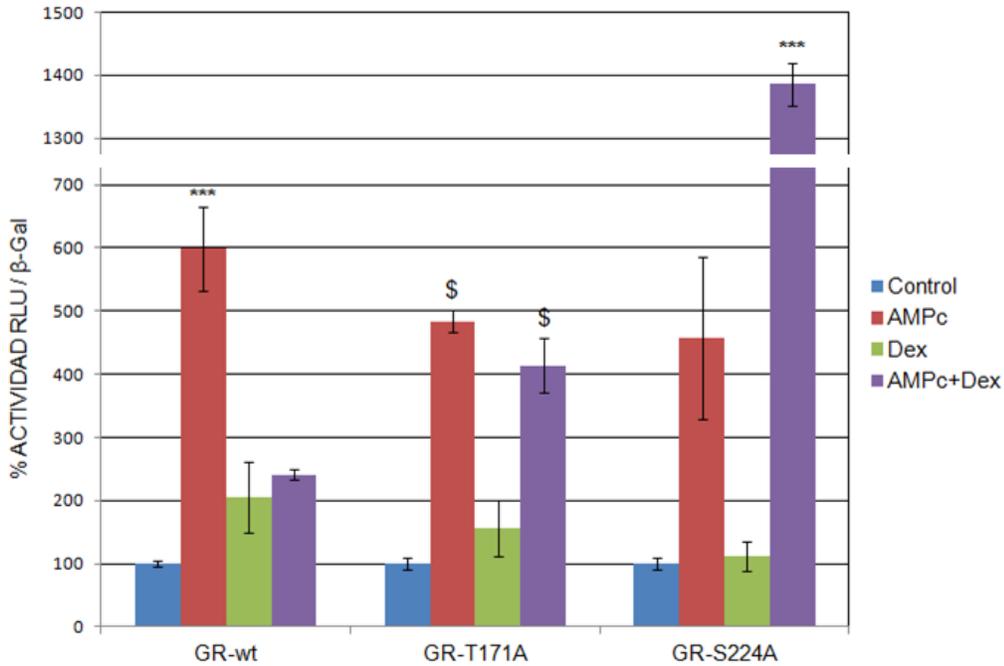


Figura 8. Efecto de GR-wt, GR-T171A y GR-S224A sobre la actividad del gen reportero. Las células fueron estimuladas por 4 horas con AMPc [1×10^{-3} M] y Dex [1×10^{-8} M] solos o combinados. Los valores se muestran en porcentajes del control \pm el error, siendo el 100 % los resultados sin estímulo (control). Tukey's HSD post hoc: *** $p < 0.005$ y \$ $p < 0.0001$ vs Control.

La mutante GR-S224 presenta un aumento en la actividad del gen reportero al estimular con db-AMPc. Con esta mutante no solamente se pierde la disminución vista en el GR-wt al aplicar ambos estímulos, db-AMPc+Dex, sino que es mayor que con sólo db-AMPc (figura 8).

Al compararse la actividad del gen reportero en condiciones basales de células transfectadas con las mutantes de GR contra el GR-wt, solo aquellas mutantes que eliminan la interferencia con la vía de PKA (GR-L501P, GR-T171A y GR-S224A) presentan una actividad menor del gen reportero (figura 9).

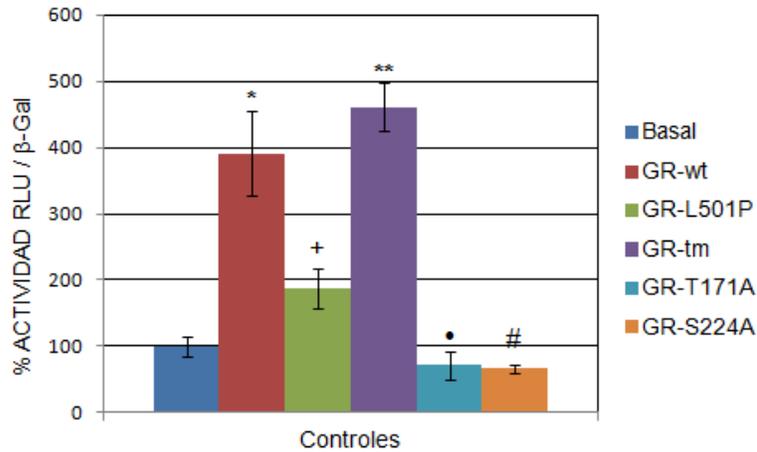


Figura 9. Actividad del reportero al utilizar las mutantes de GR sin estímulo (control). Los valores se muestran en porcentajes del basal \pm el error, siendo el 100 % los resultados de las células transfectadas sin ningún vector de GR y sin estímulo (basal). Tukey's HSD post hoc significancia: * $p < 0.005$ y ** $p < 0.0005$ vs el basal; + $p < 0.01$, # $p < 0.005$ y • $p < 0.0001$ vs el GR-wt.

Estos resultados (tabla 1) sugieren que para que ocurra la interferencia en la señalización del AMPc es necesario que la conformación del GR que permite su unión al DNA y dimerización con otras proteínas, además de que no se altere y se preserven intactos los sitios de fosforilación.

Tabla 1. Lista de las mutantes del receptor de glucocorticoides y su efecto en la interferencia de los glucocorticoides con la vía mediada por AMPc.

Mutante	Efecto de la mutación en el receptor de glucocorticoides	Respuesta de las mutantes al estímulo con db-AMPc+Dex	Ref.
GR-L501P	Afecta la dimerización y unión al DNA, al alterar el bucle-D.	= db-AMPc, se pierde la interferencia.	58, 59
GR-tm	Disminuye la interacción con co-reguladores mediada por el dominio N-terminal.	< db-AMPc, persiste la interferencia.	44
GR-T171A	Baja la estabilidad proteica e interacción con co-reguladores.	= db-AMPc, se pierde la interferencia.	39
GR-S224A	Impide la translocación nuclear e interacción con co-reguladores.	> db-AMPc, se pierde la interferencia.	37, 48

Determinar la acetilación y unión de la desacetilasa al promotor de TRH por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP).

Como se mencionó en la introducción, se demostró previamente por ChIP que la unión de GR al promotor del gen de TRH se incrementa en células estimuladas con Dex, en cambio pCREB en células estimuladas con db-AMPC; estas señales se ven disminuidas al nivel control en células incubadas con db-AMPC+Dex. Para distinguir si la falta de unión de GR y pCREB se debe a la unión de algún factor que promueva la condensación de la cromatina, se realizaron ensayos de ChIP en cultivos primarios de células hipotalámicas estimuladas por 1 hora con Dex, db-AMPC, db-AMPC+Dex y hormona tiroidea T3. Utilizando anticuerpos contra pCREB, GR, Ac-Lys, HDAC3, RNAPol II e IgG de conejo. Se realizaron 4 experimentos independientes, los datos de cuantificación y los geles de la PCR semicuantitativa se presentan en el anexo 1 (figura 27-33). Los resultados se representan en las figuras 10-13 como graficas de la presencia de los factores en el promotor de TRH, agrupados por el tipo de anticuerpo utilizado. En el anexo 1 (figura 23) se muestran los fragmentos de DNA sonicados con una longitud aproximada de 300 pb.

Como se había reportado anteriormente [5], la unión de pCREB ó GR al promotor de TRH en cultivos hipotalámicos se ve potenciada en células estimuladas con db-AMPC ó Dex (respectivamente), mientras que disminuye el reclutamiento de las proteínas a sus sitios de unión al estimular conjuntamente db-AMPC+Dex (figura 10). La estimulación con T3 no tiene ningún efecto en la unión de pCREB y GR al promotor.

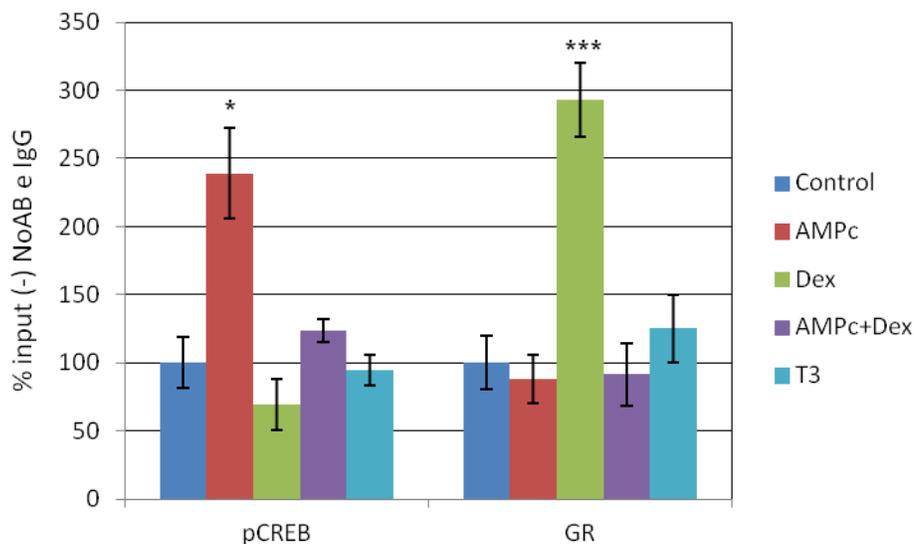


Figura 10. Unión de pCREB y GR al promotor de TRH. En cultivos primarios hipotalámicos estimuladas por 1 hr con db-AMPC [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], T3 [1×10^{-8} M] solos o combinados, se realizaron ensayos de CHIP. Los valores se muestran en porcentajes del input menos las perlas sin anticuerpo (NoAB) y el IgG de conejo \pm el error, siendo el 100 % los resultados sin estímulo (control; n=4). Tukey's HSD post hoc significance: * $p < 0.05$, *** $p = 0.001$ vs control.

La acetilación de lisinas en las histonas del promotor es considerada una marca de activación de la transcripción, ya que descondensa la cromatina permitiendo el reclutamiento de proteínas reguladoras y la maquinaria basal de transcripción. Se observó un incremento en los niveles de acetilación del promotor de TRH en respuesta a la incubación con db-AMPC (figura 11). Seguido por el aumento en los niveles de acetilación al estimular con db-AMPC+Dex, T3 y ligeramente con Dex. Un resultado no esperado fue el aumento en la acetilación al estimular con db-AMPC+Dex mayor que con Dex, así como la respuesta de la hormona tiroidea T3 que está involucrada en la represión transcripcional del gen de TRH [29].

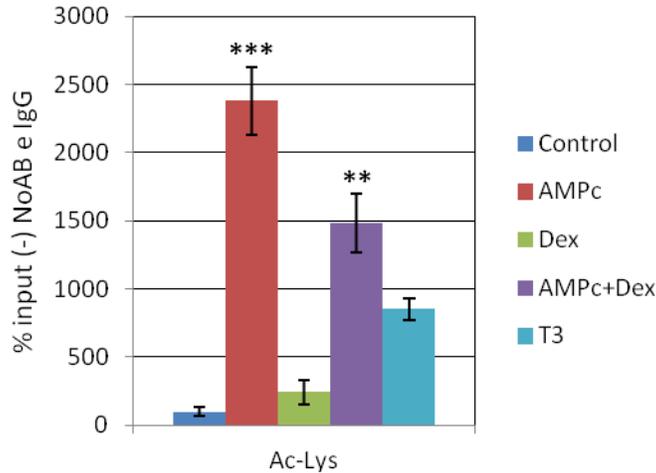


Figura 11. Acetilación de lisinas en el promotor del TRH. En cultivos primarios hipotalámicos estimuladas por 1 hr con db-AMPC [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], T3 [1×10^{-8} M] solos o combinados, se realizaron ensayos de ChIP. Los valores se muestran en porcentajes del input menos las perlas sin anticuerpo (NoAB) y el IgG de conejo \pm el error, siendo el 100 % los resultados sin estímulo (control; n=4). Tukey's HSD post hoc significance: ** $p < 0.01$, *** $p = 0.001$ vs Control.

La unión de HDAC3 al promotor del gen de TRH se encuentra aumentada al estimular con T3 (figura 12), coincidente con reportes previos [10]; mientras la estimulación con db-AMPC, Dex y db-AMPC+Dex no presentan un aumento en la unión de la HDAC al promotor.

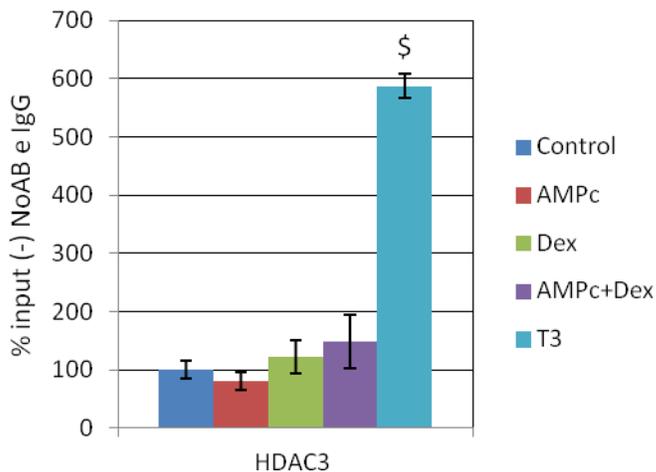


Figura 12. Reclutamiento de HDAC3 al promotor de TRH. En cultivos primarios hipotalámicos estimuladas por 1 hr con db-AMPC [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], T3 [1×10^{-8} M] solos o combinados, se realizaron ensayos de ChIP. Los valores se muestran en porcentajes del input menos las perlas sin anticuerpo (NoAB) y el IgG de conejo \pm el error, siendo el 100 % los resultados sin estímulo (control; n=4). Tukey's HSD post hoc significance: § $p < 0.0001$ vs Control.

La unión de la RNAPol II al promotor tiene un mayor aumento en respuesta al db-AMPC, la estimulación con Dex sola o combinada con db-AMPC tiene una respuesta igual al control, mientras que al estimular con T3 no se ve un reclutamiento de la RNAPol II al compararse con el control (figura 13).

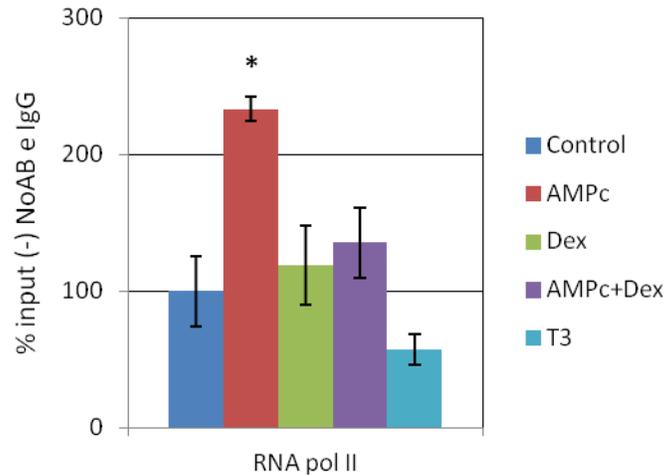


Figura 13. Reclutamiento de la RNAPol II al promotor de TRH. En cultivos primarios hipotalámicos estimuladas por 1 hr con db-AMPC [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], T3 [1×10^{-8} M] solos o combinados, se realizaron ensayos de ChIP. Los valores se muestran en porcentajes del input menos las perlas sin anticuerpo (NoAB) y el IgG de conejo \pm el error, siendo el 100 % los resultados sin estímulo (control; n=4). Tukey's HSD post hoc significance: * $p < 0.05$ vs Control.

Los ensayos de ChIP se realizaron en cultivos primarios hipotalámicos que contienen diferentes tipos celulares, que aunque el ensayo nos permite distinguir al promotor de TRH permisible para la unión de los diferentes FT, no podemos estar seguros que los resultados que vemos sean solo por consecuencia de las células TRHérgicas.

Evaluar si existe una interacción proteína:proteína entre GR y PKAcat.

La falta de unión de GR y pCREB a sus respectivos elementos de respuesta en el promotor al estimular db-AMPC+Dex, la importancia de un GR sin alteraciones

conformacionales para que se lleve a cabo la interferencia con la vía del AMPc, así como la ausencia de interacción entre GR y pCREB (A. Cote-Velez, no publicado), nos sugiere que GR esta interactuando con algún otro componente de la vía de AMPc, como la PKAcac reportado en otros sistemas [6].

Para comprobar la presencia de GR y PKAcac en las células se realizó un inmunoblot de las fracciones citoplasmáticas y nucleares de cultivos primarios hipotalámicos (figura 14). En la fracción citoplasmática se detecta GR cuando se estimula con forskolina y/o Dex; y PKAcac en mayor proporción cuando se estimula con forskolina sola o combinada con Dex. En la fracción nuclear, sólo cuando se activó con Dex se observa GR, mientras que la PKAcac se detecta en todas las condiciones. El anticuerpo contra PKAcac reconoce a los tres tipos de subunidades catalíticas alfa (40,620 Da), beta (40,708 Da) y gamma (40,434 Da); las cuales pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que pueden variar su peso molecular como se observa en los inmunoblots revelados con anti-PKAcac (2 bandas). Los resultados que se presentan en las figuras 14, 16 y 17 se muestran recortados, las membranas completas se encuentran en el anexo 1 (figura 24-26).

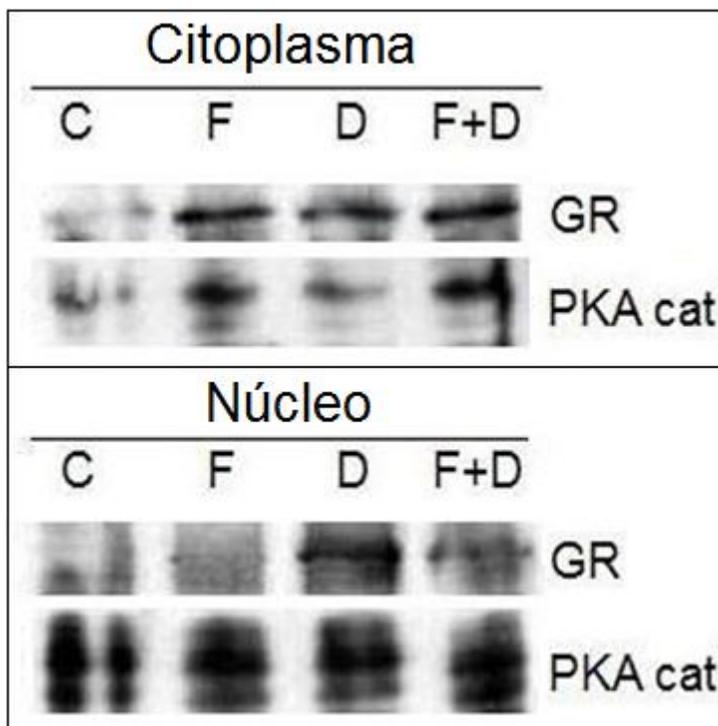


Figura 14. Niveles de GR y PKAcac en cultivos primarios hipotalámicos. Extractos citoplasmáticos y nucleares estimuladas por 1 hora en situación Control (C), Forskolina (F) [1×10^{-5} M], Dex (D) [1×10^{-8} M] y combinados (F+D) fueron analizados por ensayos de inmunoblot, cargando 80 μ g de proteínas en cada carril. En el inmunoblot se utilizaron los anticuerpos de GR (95 kDa) y PKAcac (40 kDa).

En la figura 15 se tiñó con rojo Ponceau la membrana utilizada para el inmunoblot de la figura 14 como control de carga, 3 meses después de realizado el inmunoblot, por lo que la membrana tubo que rehidratarse con el buffer de transferencia y colocarla en agitación en rojo Ponceau 20X por 2 horas.

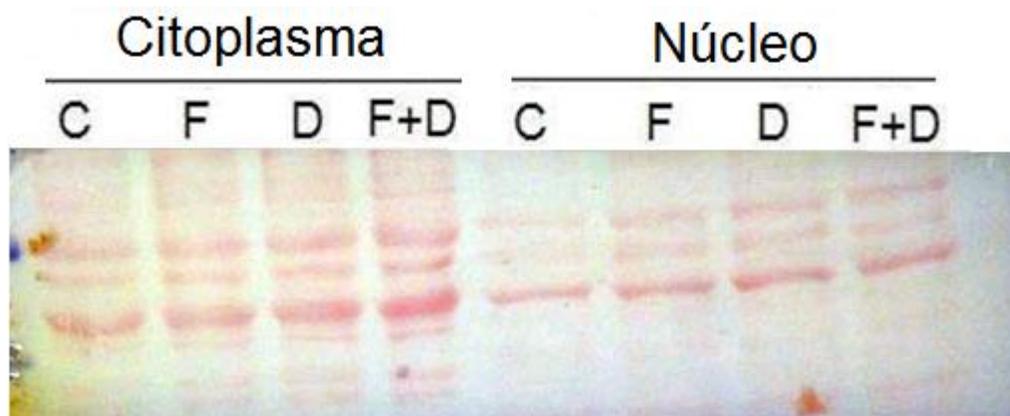


Figura 15. Control de carga del inmunoblot de la figura 14. La membrana se tiñó con rojo de Ponceau 20X por 2 horas.

Se procedió a inmunoprecipitar (IP) GR o PKAcat de extractos citoplasmáticos y nucleares de células hipotalámicas, seguido de un inmunoblot para identificar a GR y PKAcat en las IPs (figura 16 y 17).

La IP de GR (figura 16) muestra en el inmunoblot utilizando el anti-GR, la banda esperada de 95 kDa en los extractos citoplasmáticos bajo todos los estímulos, por lo que el anticuerpo reconoce a GR en su forma inactiva unido al complejo de las proteínas “heat shock”. En el núcleo, se detecta más GR en los extractos provenientes de células estimuladas con Dex y con db-AMPC+Dex. Utilizando la parte inferior de las membranas para revelar con anti-PKAcat el inmunoprecipitado de GR, se detectó PKAcat tanto en el citoplasma al estimular con Dex y db-AMPC+Dex, así como en el núcleo bajo todos los estímulos, pero en mayor intensidad con Dex y db-AMPC+Dex. Estos resultados muestran que el inmunoprecipitado de GR contiene a PKAcat en mayor proporción en células donde GR fue activado y que la interacción entre GR:PKAcat puede darse en ambos compartimentos celulares.

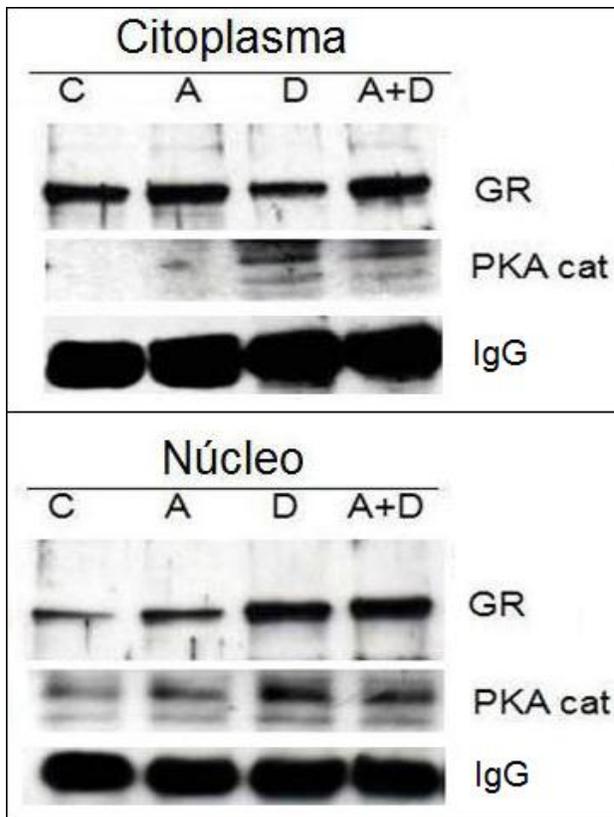


Figura 16. Inmunoprecipitación de GR en extractos citoplasmáticos y nucleares de células hipotalámicas estimuladas por 1 hora en situación Control (C), AMPc (A) [1×10^{-3} M], Dex (D) [1×10^{-8} M] y combinados (A+D). La inmunoprecipitación de los extractos citoplasmáticos y nucleares fue revelado por inmunoblot utilizando los anticuerpos de GR (95 kDa) y PKAcad (40 kDa). Se utilizó el IgG de conejo como control de carga.

Para corroborar lo anterior, se realizó la inmunoprecipitación de los extractos citosólico o nuclear con anti-PKAcad y el inmunoblot revelado con ambos anticuerpos (figura 17). La mayor proporción de PKAcad se observa en el citosol de células estimuladas con db-AMPc o control, mientras que en el núcleo con los tratamientos de db-AMPc o Dex, seguido por la combinación de ambos. El inmunoprecipitado con PKAcad contiene GR en el citosol en el control y al estimular con db-AMPc solo o combinado con Dex, mientras que al estimular solo con Dex disminuye el GR. En cambio, la inmunoprecipitación de PKAcad de los extractos nucleares de células estimuladas con Dex contuvieron a GR en mayor proporción en el núcleo, seguido de la co-estimulación de db-AMPc+Dex y del control.

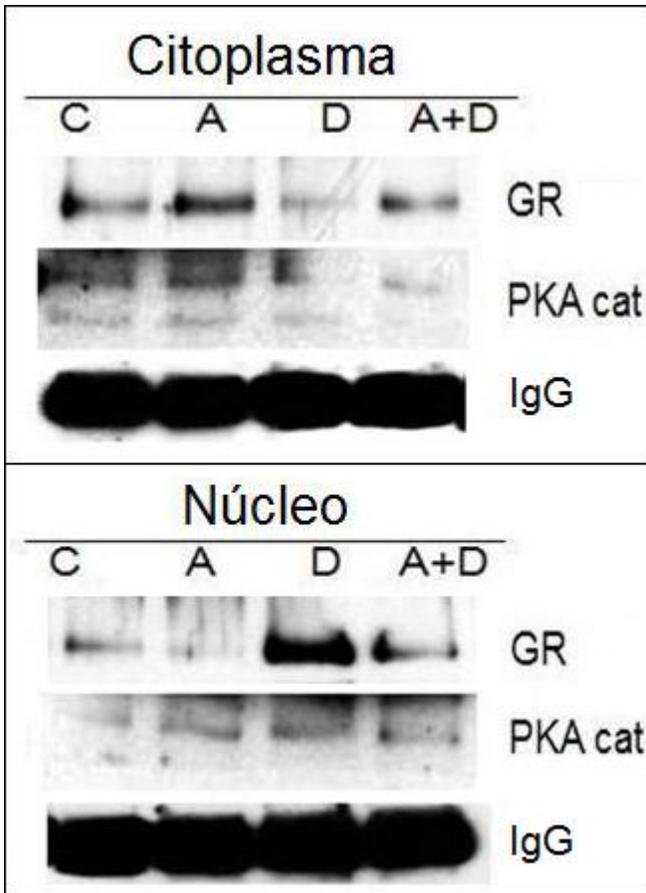


Figura 17. Inmunoprecipitación de PKAcat en extractos citoplasmáticos y nucleares de células hipotálamicas estimuladas por 1 hora en situación Control (C), AMPc (A) [1×10^{-3} M], Dex (D) [1×10^{-8} M] y combinados (A+D). La inmunoprecipitación de los extractos citoplasmáticos y nucleares fue revelado por inmunoblot utilizando los anticuerpos PKAcat (40 kDa) y GR (95 kDa). Se utilizó el IgG de conejo como control de carga.

Determinar la localización intracelular de GR y la activación de PKAcat por inmunocitoquímica.

Las inmunocitoquímicas se realizaron en células hipotálamicas estimuladas por 45 minutos con forskolina (Fsk), Dex y combinados. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos de las células. En el anexo 1 (figura 22) se encuentra el control de especificidad de los anticuerpos secundarios fluorescentes. El conteo de las células se realizó a mano.

En la inmunocitoquímica de PKAcat (figura 18) el anticuerpo reconoce a una región de 95 aminoácidos de PKAcat entre el 296 y el 320, esta región de PKAcat se encuentra cerca del bucle de activación (residuos 184-204) y el C-terminal (residuos 301-350), los cuales quedan expuestos al liberarse la PKAcat (forma activa) de la subunidad reguladora. En situación control se ve una activación basal de PKAcat, al

presentar señal aproximadamente el 15% de las células (17 células de 115). Al estimular con Fsk se activa a la enzima adenilato ciclasa, aumentando los niveles intracelulares de AMPc, los cuales se unen a las subunidades reguladoras de PKA, causando la liberación y la activación de PKAcat; con una señal del 97% aproximadamente (99 células de 102). El tratamiento conjunto de Fsk+Dex no afecta la activación de PKAcat, ya que muestra la misma respuesta al compararse con el estímulo de Fsk, al obtener un señal del 93% aproximadamente (92 células de 99). En cambio, al estimular con Dex no se muestra un efecto en la activación de la PKAcat, al presentar una señal del 17% aproximadamente (24 células de 142), observando una respuesta igual que en el control.

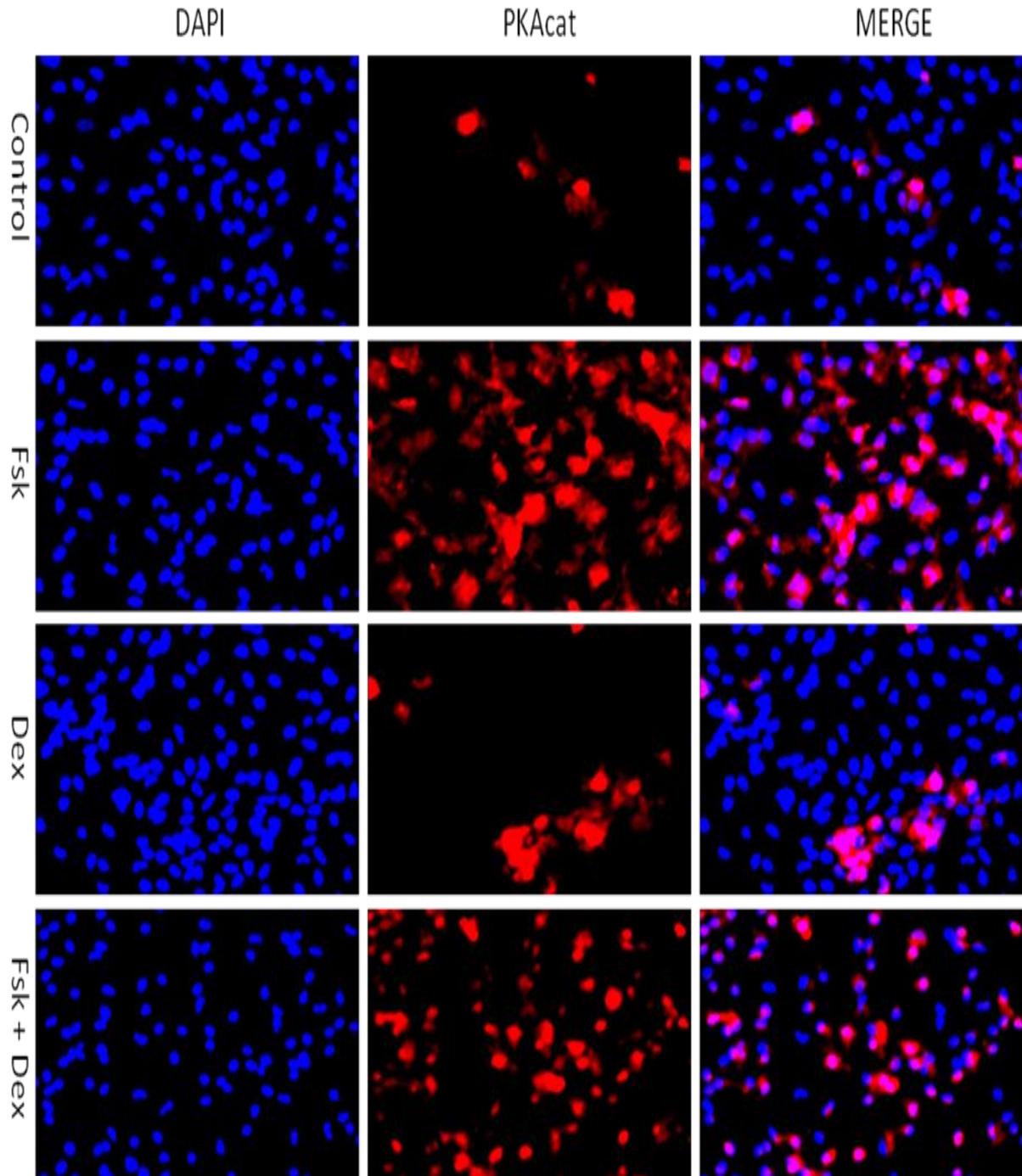


Figura 18. Inmunocitoquímica de PKAcac en células hipotalámicas estimuladas por 45 min en situación Control, Forskolina [1×10^{-5} M], Dex [1×10^{-8} M] y combinados. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos, el anticuerpo primario PKAcac y el secundario Chromeo 546 Goat anti-Rabbit IgG; ($n=2$).

La proteína CREB es activada a través de la fosforilación (S-133) que se lleva a cabo en el núcleo por la PKAcat. La inmunocitoquímica de pCREB (figura 19) nos muestra su activación en el núcleo, ya que el anticuerpo reconoce a la S-133 fosforilada de CREB. En condiciones control CREB tiene una actividad basal, ya que muestra una activación sin necesidad de estímulo de aproximadamente el 20% (17 células de 83). Al estimular con Fsk se activa a la PKAcat a través de la adenilato ciclasa, aumentando la presencia de pCREB en un 98% aproximadamente (59 células de 60). La estimulación con Dex podría incrementar ligeramente la activación de pCREB al tener 35% aproximadamente (29 células de 83), al compararse contra el control. En cambio, la estimulación conjunta de Fsk+Dex causa la disminución en la activación de CREB vista con Fsk, en un 36% aproximadamente (31 células de 85). Lo cual confirma que la estimulación conjunta de Fsk+Dex disminuye la activación de CREB, correlacionando con la disminución en los niveles de transcripción del gen reportero observado en las transfecciones.

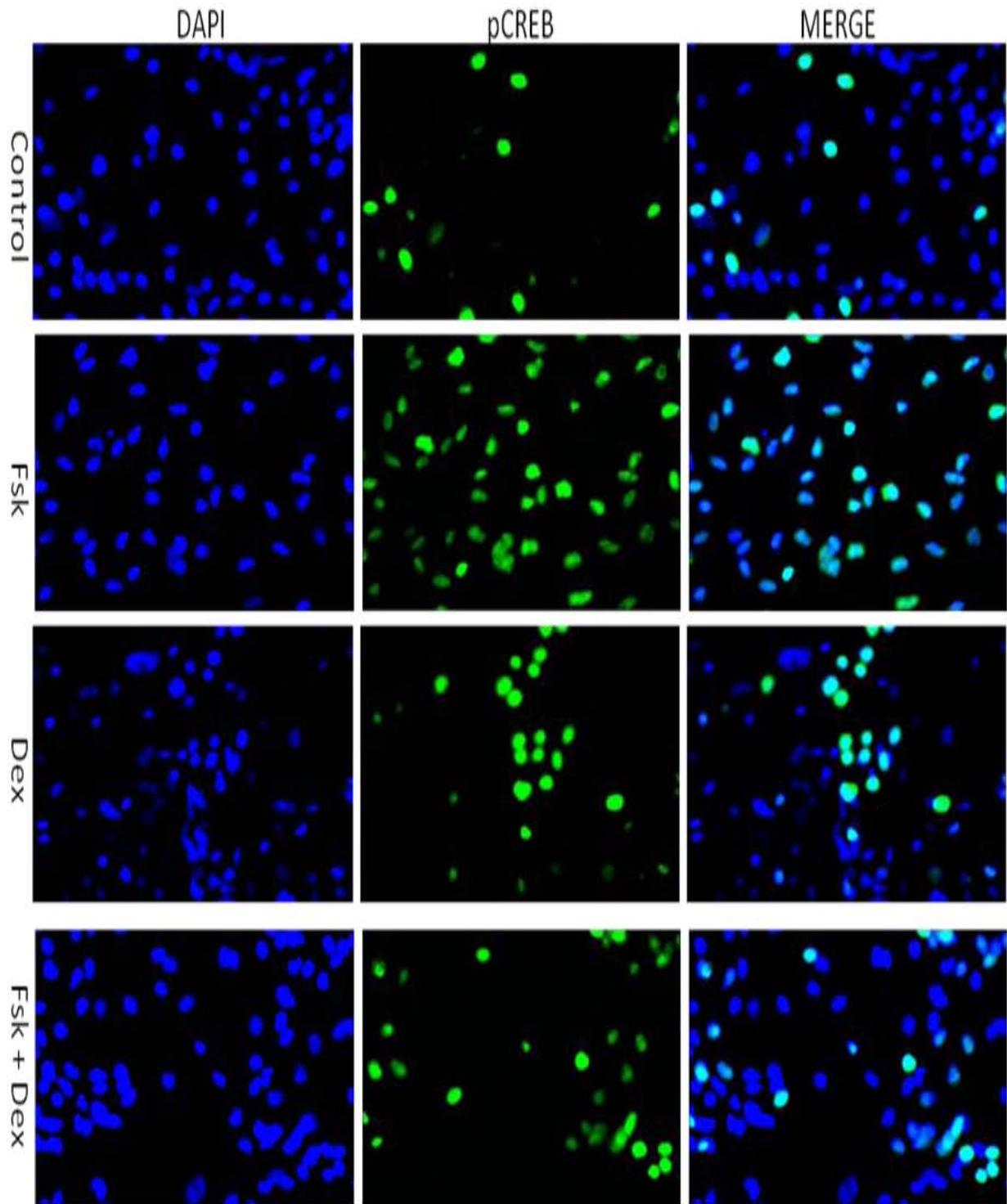


Figura 19. Inmunocitoquímica de pCREB en células hipotalámicas estimuladas por 45 min con Forskolina [1×10^{-5} M], Dex [1×10^{-8} M] y combinados. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos, el anticuerpo primario pCREB y el secundario Chromeo 488 Goat anti-Rabbit IgG. (n=2)

En la inmunocitoquímica de GR (figura 20) se observa la localización del receptor activado o acoplado con el complejo proteico con proteínas de “heat shock” en el citoplasma y activado en el núcleo. En células hipotalámicas en condiciones control muestran una localización del receptor en el citoplasma del 26% aproximadamente (21 células de 81), encontrándose el 12% aproximadamente de señal en los núcleos (10 células de 81). Al estimular con Fsk se ve una localización similar al control, con una presencia del receptor del 18% aproximadamente en citoplasma (20 células de 110), mientras que en el núcleo se observa el 8% aproximadamente (9 células de 110). La activación de GR por Dex causa su translocación total al núcleo con una presencia del 36% aproximadamente (48 células de 135), sin que se observe al receptor en citoplasma. En cambio la estimulación conjunta de Fsk+Dex interfiere con la translocación de GR al núcleo vista al estimular solo con Dex, al aumentar en un 33% aproximadamente (43 células de 132) la presencia del receptor en el citoplasma, mientras que en el núcleo se observa a GR en un 55% aproximadamente (72 células de 132).

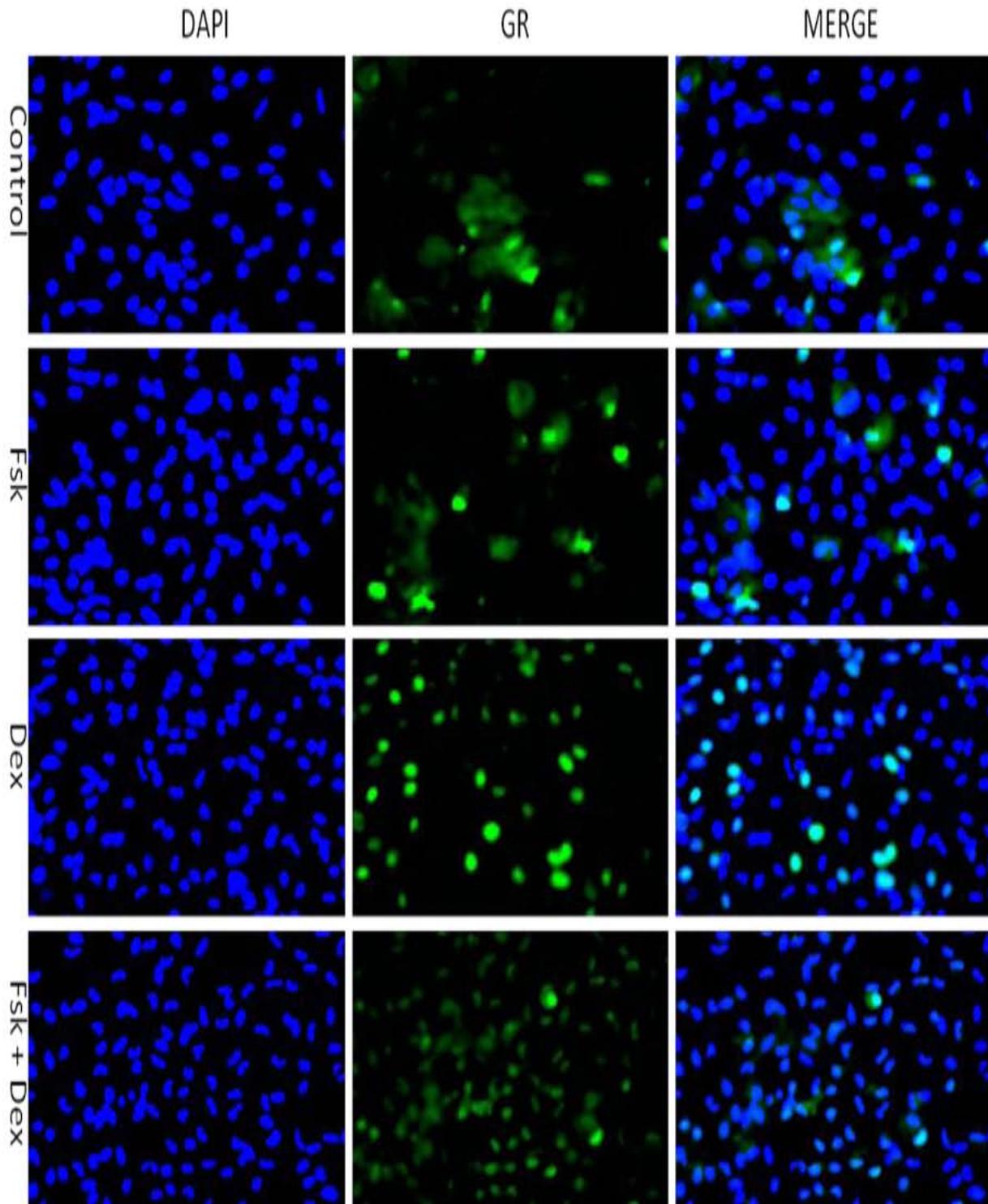


Figura 20. Inmunocitoquímica de GR en células hipotálamicas estimuladas por 45 min en situación control, Forskolina [1×10^{-5} M], Dex [1×10^{-8} M] y combinados. Se utilizó DAPI para marcar los núcleos, el anticuerpo primario GR y el secundario Chromeo 488 Goat anti-Rabbit IgG. (n=2)

Estos datos sugieren que la translocación de GR al núcleo se ve alterada al estimular conjuntamente Fsk+Dex, al aumentar su presencia en el citoplasma.

Discusión

El GR es fosforilado en cuatro sitios principales (T171, S224, S232 y S246) en la región N-terminal, implicada en la interacción con co-reguladores [38]. La fosforilación de GR en la T171 se lleva a cabo por la GSK3 [39], la S246 por la JNK (familia de MAPK), las S224 y S232 son fosforiladas por CDK [37]. El GR se encuentra constitutivamente fosforilado en las posiciones T171 y S246, mientras que la fosforilación de S224 y S232 es dependiente del tratamiento con hormona [37]. La fosforilación en T171 reduce la unión de GR a GRE, sin que se afecte la represión inducida por GR sobre los promotores activados por AP1, donde la función de transactivación de los factores transcripcionales unidos al DNA es reprimida por una interacción proteína:proteína vía GR (“tethering”) [39,61]; estos sugieren que el GR mutado podría unirse con mas afinidad al DNA pero también, que esta región del GR fuera importante para interaccionar con otras proteínas. Dado que los resultados de GR-T171A son similares a los obtenidos previamente con GR-L501P [13] que tiene modificado una región del dedo de Zn que se une al DNA y es importante para la interacción con otras proteínas (bucle-D) [58,59], juntos apoyan la necesidad de que se encuentre íntegra esta región para que ocurra el efecto de interferencia al estimular db-AMPC+Dex.

El GR-S224A evita la fosforilación en S224 de GR, llevada a cabo por complejos ciclina/CDK y ERK (familia MAPK), al igual que la S232 (con la excepción de CDK5 y p38 MAPK) [36]. El estado de fosforilación de los sitios S224 y S232 en GR influyen en su translocación entre el citoplasma y el núcleo [48], así como la interacción proteína:proteína con distintos reguladores, ya sean activadores o represores de la transcripción [37]. En trabajos previos del laboratorio se vio que el inhibidor de ERK en cultivos hipotalámicos evita la interferencia del estímulo con db-AMPC+Dex sobre los niveles del RNAm de proTRH [49]. Alteraciones tanto en la localización celular como en la interacción con otras proteínas en la mutante GR-S224A, no solo evitan la

interferencia al estimular db-AMPC+Dex observada en los resultados con el GR-wt, sino que permiten una mayor estimulación que la detectada con sólo db-AMPC. Esto último pudiera ser explicado por el efecto de Dex, en aumentar la expresión de la cinasa inducida por suero y glucocorticoides (SGK), la cual puede activar a CREB [50]. Para comprobar este punto, sería necesario evaluar que al estimular con Dex la mutante GR-S224A es capaz de unirse al DNA para aumentar la expresión de SGK y comprobar que este aumento tiene algún efecto en la activación de CREB (por inmunocitoquímica) y en la transcripción de TRH.

Una opción que debe tomarse en cuenta en la respuesta basal de las mutantes es que:

- 1) Un aumento considerable de GR como ocurre por las transfecciones, puede alterar la proporción de co-reguladores libres capaces de participar en los eventos de activación o represión de la transcripción.
- 2) Las mutantes estén constitutivamente activadas y que los co-reguladores que unan estas mutantes tiendan a ser co-represores o co-activadores de la transcripción.
- 3) Las mutaciones en GR L501P, T171A y S224A impidan que el receptor de glucocorticoides interactúe con diferentes proteínas o co-reguladores.

Para investigar sobre estas preguntas se deben hacer experimentos de ChIP para comprobar que las mutantes de GR pueden unirse al promotor de TRH, así como ensayos de interacción proteína:proteína con los co-reguladores y componentes de la vía de PKA, para comprobar si esta falta de interacción es la que causa la pérdida en la interferencia al co-estimular db-AMPC+Dex. En conjunto, los resultados apoyan la necesidad de la molécula de GR activa y con pocas alteraciones conformacionales, para que pueda interferir con la señalización mediada por db-AMPC en la transcripción del proTRH.

Los cultivos primarios hipotalámicos contienen diferentes grupos neuronales como los somatotropos, lactotropos, corticotropos, tirotropos y gonadotropos, así como células gliales [24,25]. Los resultados en las inmunoprecipitaciones, ChIPs e inmunocitoquímicas son el conjunto de las diferentes células dentro del cultivo, no pudiéndose distinguir solo la respuesta de las células TRHérgicas. Para haber observado que los resultados pertenecen a las células TRHérgicas se podrían utilizar diferentes métodos, como los anticuerpos contra TRH (para los ensayos de inmunocitoquímica) y

la selección por FACS de las células TRHérgicas a través de ratones transgénicos con la verde fluorescente acoplada a la expresión del gen de TRH (para los ensayos de inmunoprecipitación y ChIP).

La estimulación con db-AMPC en las células hipotalámicas causan un incremento en la transcripción del RNAm de proTRH [4]. Los ensayos de ChIP al estimular con db-AMPC mostraron un aumento en el reclutamiento de pCREB, la RNAPol II y los niveles de acetilación en el promotor de TRH. El incremento en los niveles de acetilación en el promotor es consistente con el incremento en la unión de pCREB que favorece el reclutamiento de co-activadores con la actividad de acetiltransferasa (ej. CBP y p300), promoviendo la descondensación de la cromatina y la posterior unión de la maquinaria basal de transcripción. La disminución en la unión de la polimerasa por incubación con T3 apoya los resultados de la unión de la desacetilasa al promotor y correlacionan con la disminución en los niveles del RNAm de TRH cuando se incubaba con T3 [4].

La estimulación conjunta db-AMPC+Dex aumenta la acetilación de lisinas en el promotor de TRH, esto puede explicarse ya que aunque la unión de GR y pCREB al promotor esta disminuida, permanecen unidos al promotor otros FT como c-Jun y c-Fos cuya expresión se incrementa con el tratamiento de 8Br-AMPC [5], y pueden reclutar al co-activador CBP [52,53] manteniendo los niveles basales del RNAm de TRH. En este sentido es importante recalcar que tanto a nivel del RNAm [7] y de transcripción [3], la incubación de db-AMPC+Dex no causa un valor menor de lo observado en células no estimuladas (control). La T3 inhibe la transcripción y los niveles del RNAm de TRH, además de promover la unión de la desacetilasa al promotor [10,34]. Nuestros resultados muestran un aumento en la acetilación del promotor; sin embargo, esto se ha reportado para el promotor de TSH α donde bajo el tratamiento con T3 se incrementan las marcas de acetilación en la histona 3, mientras la estimulación con db-AMPC aumenta la acetilación de la histona 4 [40,41]. En el caso de las células incubadas con T3, el aumento en la acetilación junto con el aumento en la unión de la HDAC3 nos muestra la dinámica que ocurre dentro del promotor, donde al cambiar los patrones de acetilación en las diferentes lisinas de las histonas puede llevar a la activación o represión de la transcripción; tal y como ocurre al estimular con T3 en el

promotor de TSH α aumentando los niveles de Ac-Lys 9 y 18 en la histona 3, así como la disminución de la Ac-Lys 27 de la histona 3 y su subsecuente tri-metilación asociada con la represión transcripcional [41]. Nuestro anticuerpo no permite distinguir entre los diferentes patrones de acetilación en las histonas, solo cambios globales en la acetilación del promotor. Para investigar mejor este punto sería necesario contar con anticuerpos específicos para las diferentes marcas de acetilación y tri-metilación en las lisinas de las histonas 3 y 4.

En comparación a lo observado con la estimulación inhibitoria por T3, la incubación con Dex combinada con db-AMPC no causa la unión de la desacetilasa al promotor, en cambio se aumentan los niveles de acetilación en el promotor de TRH. Estos resultados apuntan a que la disminución en la unión de GR y pCREB a sus elementos de respuesta en el promotor cuando se estimula con db-AMPC+Dex, no se debe al reclutamiento de la HDAC que pudiera causar cambios en la condensación de la cromatina. Por lo tanto, el receptor de glucocorticoides podría estar interactuando directamente con algún componente de la vía del AMPC, causando la interferencia vista al estimular db-AMPC+Dex.

La inhibición en la fosforilación de CREB en neuronas CRHérgicas del PVN de animales tratados con glucocorticoides al compararse con el estímulo de Fsk [14]. La estimulación conjunta de db-AMPC+Dex causa que pCREB, GR y SP1 no se unan a sus elementos de respuesta en el promotor [5]. Además la activación de CREB y SP1 en el núcleo es debida mayoritariamente a la actividad de PKAcat [4,5]. Por lo tanto, la falta de unión de los FT al DNA y la disminución en la activación de CREB, ayudaron a proponer el modelo donde una interacción entre GR y PKAcat evitaría que los FT se unieran a sus elementos de respuesta en el promotor y que PKAcat activara a CREB.

En citosol el GR es parte de un complejo con proteínas de “heat shock” que lo mantiene en un estado inactivo, necesitando de un cambio conformacional que lo libere del complejo proteico. En los resultados de inmunoprecipitación de GR en los extractos citoplasmáticos (figura 16), se encuentra al receptor bajo todos los estímulos, por lo que el anticuerpo es capaz de reconocer a GR tanto unido al complejo proteico, como al libre (activado). La interacción de GR y PKAcat se da cuando el receptor está en su

forma activada en el citosol al estimular con Dex o db-AMPC+Dex. En el núcleo, GR aumenta su presencia al estimular con Dex solo o combinado con db-AMPC, encontrándose la interacción con PKAcat en todos los tratamientos, ya que en el núcleo GR se encuentra activado bajo todos los estímulos.

La PKA es un tetrámero formado por dos subunidades reguladoras y dos subunidades catalíticas. La PKAcat se encuentra unida a la subunidad reguladora y es liberada una vez que se le une a la subunidad reguladora el AMPc [68,69]. Las IPs de GR y PKAcat no son inversas, ya que en los resultados de PKAcat se ve una co-inmunoprecipitación de GR en el citosol al estimular con db-AMPC y el control (figura 17); esto podría ser explicado, porque el anticuerpo contra GR reconoce al receptor dentro del complejo proteico con las proteínas de “heat shock”, impidiendo que PKAcat interactúe con GR como se ve en los resultados de la figura 16. Al estimular con Dex, se transloca al núcleo el GR activado, aumentando su interacción con PKAcat, mientras que al estimular con db-AMPC la PKAcat aumenta en núcleo, pero no el GR al encontrarse unido al complejo proteico con las proteínas de “heat shock”, por lo que no se observa su interacción. El aumento de PKAcat en núcleo al estimular con Dex fue un resultado inesperado pero podría ser explicado por la activación del receptor de glucocorticoides membranal, el cual puede llegar a activar la vía de AMPc/PKA o ERK1/2 [51]; para investigar si está involucrado el receptor membranal de glucocorticoides se podría estimular a las células con corticosterona o Dex acoplada a BSA (que impide atravesar la membrana celular) activando solo la respuesta del receptor membranal y no al citoplasmático.

La estimulación con db-AMPC+Dex causa la activación de GR aumentando su interacción con PKAcat tanto en citoplasma como en núcleo (figura 17). La activación de PKAcat al tratar las células con db-AMPC+Dex no se muestra tan fuerte como al estimular solo con db-AMPC, ya que en los resultados de inmunocitoquímica (figura 18) al estimular con Fsk+Dex se ve la misma activación de PKAcat que al utilizar solo Fsk, se tendría que revisar que no haya sido algún problema con el análogo permeable del AMPc. En conjunto los resultados muestran una interacción directa entre GR:PKAcat la cual puede darse en la región citoplasmática y nuclear.

En los experimentos antes mencionados hicieron falta la realización de diversos controles como: 1) La contaminación entre las fracciones citoplasmáticas y nucleares; 2) La especificidad de los anticuerpos contra péptidos de epítipo y 3) El control del input en las inmunoprecipitaciones.

La producción del TRH no sólo ocurre en el PVN [26], sino también en otras áreas del hipotálamo como el área preóptica, anterior, lateral, cuerpos mamilares, dorsomedial, supraóptico y supraquiasmático [27]. Sin embargo, la regulación negativa en la expresión de TRH por T3 (en el hipotálamo) solo ocurre en el PVN, afectando al eje HPT [3,29]. El GR también se expresa ampliamente en el hipotálamo, teniendo una expresión más alta en las neuronas parvocelulares del PVN y ARC [67]. Para poder distinguir a las neuronas TRHérgicas del PVN y ver su respuesta, sería necesario realizar las inmunocitoquímicas junto con una hibridación in situ en cortes del cerebro. En este trabajo se realizaron las inmunocitoquímica en los cultivos primarios hipotalámicos. Los resultados de las inmunocitoquímicas muestran que la activación de PKAcat no se ve afectada al estimular Fsk+Dex, por lo tanto la disminución en la activación de CREB no es causada por la falta de activación de PKAcat. Al no aplicarse ningún estímulo (control) se observa la activación de CREB, esta fosforilación podría estar mediada por la PKAcat que también se observa activada en situación control. La estimulación con Dex causa la activación de GR y su translocación al núcleo, en cambio al estimular con Fsk+Dex se aumenta la localización de GR en el citoplasma, lo que indica que se está interfiriendo con la correcta translocación del receptor al núcleo. En conjunto estos resultados y lo visto en las inmunoprecipitaciones nos podrían sugerir la interacción entre GR activado y PKAcat postulada en el modelo, impidiendo la correcta translocación al núcleo de GR y la activación de CREB. Para poder comprobar la interacción entre GR activado y PKAcat directamente en las células, se podrían realizar estrategias como: 1) Una doble inmunocitoquímica, 2) Ensayos de complementación con la verde fluorescente y 3) Ensayos de FRET.

Por último para comprobar que la interacción de GR activado y PKAcat sea la responsable en reprimir la activación de CREB y el transporte de GR al núcleo, se podría realizar una triple inmunocitoquímica, donde se vería la respuesta de las tres

proteínas al estimular conjuntamente Fsk+Dex; esperando que la co-localización de PKAcat y GR, correlacione con la disminución en la activación de CREB y con un aumento de GR en el citoplasma.

En resumen, para que se lleve a cabo la interferencia en la transcripción de los glucocorticoides con la vía del AMPc es importante que GR tenga intacto el dominio DBD donde se encuentra el bucle-D necesario en la dimerización, así como los sitios de fosforilación S224 y T171 en la región N-terminal.

Los resultados de las inmunoprecipitaciones apoyan el modelo planteado de una interacción proteína:proteína entre GR:PKAcat que puede darse tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células, impidiendo la unión de los FTs al DNA. En los resultados no se encontró el reclutamiento de la HDAC al promotor que pudieran causar cambios estructurales en la cromatina que lleven a la condensación y silenciamiento del gen de TRH al estimular conjuntamente db-AMP+Dex, en cambio se aumentan los niveles de acetilación en el promotor. En base a los resultados se modifico el modelo postulado (figura 21), agregando que la interacción GR:PKAcat puede darse tanto en núcleo como en citoplasma y que la falta de unión de los FTs al promotor no causa el reclutamiento de la HDAC al promotor que disminuya los niveles de acetilación en el promotor.

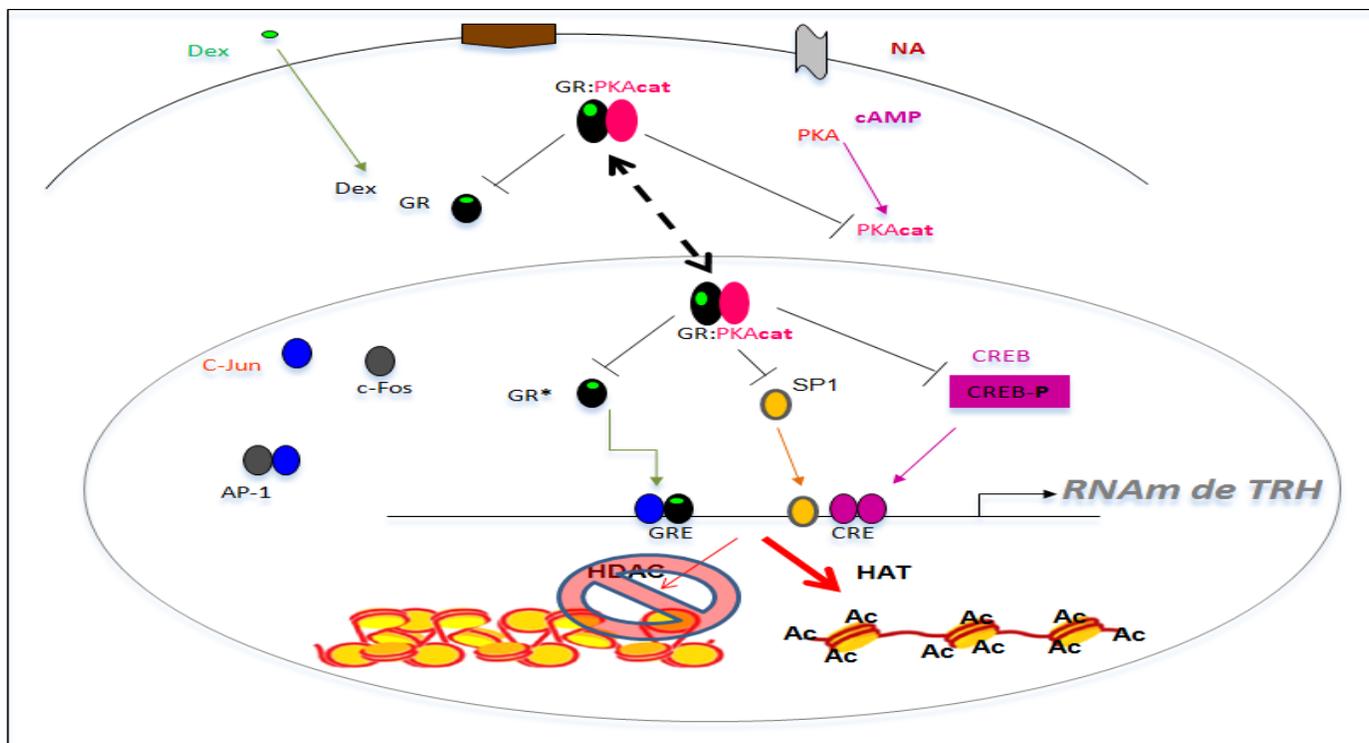


Figura 21. Modelo de la interferencia de los glucocorticoides a la activación transcripcional del gen de TRH mediada por la señalización del AMPc.

La interferencia de los glucocorticoides a la activación transcripcional del gen de TRH mediada por AMPc, podría tener consecuencia dentro del eje HPT en el organismo al atenuar la respuesta del eje frente a un evento estresor. En el laboratorio se demostró que la exposición de ratas al frío activa al eje HPT incrementando los niveles de TRH, para activar la termogénesis a través de las hormonas tiroideas [9]. Los niveles de TRH disminuyen después de 2 horas a pesar de que los animales continúen en el frío, correlacionando con un incremento en los niveles de glucocorticoides a ese tiempo [9]. Los animales sometidos a un estresor 2 horas antes de estar expuestos al frío, no presentan la activación esperada del eje HPT [70]. En cambio, animales con niveles basales altos de corticosterona provocados por una dieta de restricción calórica, presentan una activación mayor del eje HPT [71]. Lo que sugiere, que la inhibición del estrés al eje HPT depende de la activación simultánea del GR por un aumento de corticosterona y no a las concentraciones basales existentes, como se había reportado para otros genes [72].

Conclusión

- 1) Ocurre una interacción proteína-proteína entre GR y PKAc que puede suceder tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula.
- 2) Los sitios de fosforilación en la región N-terminal de GR (T171 y S224) son importantes para que se lleve a cabo la interferencia de los glucocorticoides en la activación de la transcripción mediada por AMPc.
- 3) La estimulación conjunta db-AMPc+Dex causa un aumento en los niveles de acetilación en el promotor de TRH y no el reclutamiento de la HDAC que pudiera causar la disminución en la unión de pCREB y GR en el promotor del gen de TRH, al promover la condensación de la cromatina.
- 4) La activación de CREB y la translocación de GR al núcleo se disminuyen al co-estimular Fsk+Dex en los cultivos primarios hipotalámicos.

Perspectivas

- 1) Evaluar en las mutantes de GR, si la pérdida de interferencia en la transcripción de TRH al co-estimular db-AMPc+Dex, es causada por la falta de interacción entre GR y PKAc.
- 2) Evaluar en las células TRHérgicas del cultivo primario, si la interacción entre GR y PKAc es la responsable de causar:
 - a) La disminución en la activación de CREB.
 - b) La disminución en los niveles de TRH.

3) Evaluar en las células TRHérgicas del cultivo primario el estado de la cromatina en el promotor de TRH utilizando anticuerpos específicos contra las marcas de acetilación de histonas, marcas de metilación de histonas y contra la HDAC.

Bibliografía

1. P. Joseph-Bravo, *et al.*, 2004. Hypophysiotropic TRH neurons as transducers of energy homeostasis. *Endocrinology* **145**, 4813-4815.
2. R.M. Lechan, *et al.*, 2006. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog Brain Res* **153**, 209-235.
3. A. Cote-Vélez, *et al.*, 2005. Dexamethasone represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *Journal of molecular endocrinology* **34**, 177-197.
4. M.Y. Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010. pCREB and thyroid hormone receptor have independent response elements in the rat thyrotropin-releasing hormone promoter; an analysis in hypothalamic cells. *Neuroendocrinology* **91**, 64-76.
5. M.Y. Díaz-Gallardo, *et al.*, 2010. A rapid interference between glucocorticoids and cAMP-activated signaling in hypothalamic neurons occurs at the CRE-like and composite GRE site of TRH gene promoter. *Neuroendocrinology* **22**, 282-293.
6. V. Doucas, *et al.*, 2000. Cytoplasmic catalytic subunit of protein kinase A mediates cross-repression by NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *PNAS USA* **97**, 11893-11898.
7. L. Pérez-Martínez, *et al.*, 1998. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with cAMP pathway. *Neuroendocrinology* **68**, 345-354.
8. O. Kassel, *et al.*, 2007. Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Molecular and cellular endocrinology* **275**, 13-29.
9. R.M. Uribe, *et al.*, 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* **58**, 140-145.
10. S. Ishii, *et al.*, 2004. Aberrant Dynamics of Histone Deacetylation at the Thyrotropin-Releasing Hormone Gene in Resistance to Thyroid Hormone. *Mol. Endocrinol.* **18**, 1708-1720.
11. Van der Laan, *et al.*, 2008. Nuclear Receptor Coregulators Differentially Modulate Induction and Glucocorticoid Receptor-Mediated Repression of the Corticotropin-Releasing Hormone Gene. *Endocrinology*, **149** (2), 725-732.
12. E.A. Nillni. 2010. Regulation of the hypothalamic Thyrotropin Releasing Hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front. Neuroendocrinol.*
13. Israim Sotelo Rivera, 2010. Caracterización de la interferencia mutua entre la señalización de glucocorticoides y AMPc en el gen proTRH. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UAEM.
14. R.M. Lechan, *et al.*, 1997. Glucocorticoids Inhibit Stress-Induced Phosphorylation of CREB in Corticotropin-Releasing Hormone Neurons of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus. *Neuroendocrinology* **66**, 86-97.
15. W. Balkan, *et al.*, 1998. Expression of rat thyrotropin-releasing hormone gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrine society* **139**, 252-259.
16. J. Boler, *et al.*, 1969. The identity of chemical and hormonal properties of the thyrotropin releasing hormone and pyroglutamyl-histidyl-proline-amide. *Biochem Biophys Res Commun* **37**, 705-710.

17. R. Lechan, *et al.*, 1986. Thyrotropin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science* **231**, 159-161.
18. K. Schmidt-Nielsen, *et al.*, 1986. Adaptation and Environmental. *Animal Physiology*, 5 Ed. Cambridge University. New York, USA.
19. M. Bear, *et al.*, 1996. Exploring the brain. Neuroscience. Williams and Wilkins, USA.
20. W.E. Armstrong, *et al.*, 1985. Hypothalamic, supraoptic and paraventricular nuclei. In the rat nervous system. G. Paxinos, ed. Sidney, 119-1128.
21. R. Burgus, *et al.*, 1969. Molecular structure of the hypothalamic hypophysiotropic TRF factor of ovine origin: mass spectrometry demonstration of the [PCA-His-Pro-NH₂ sequence]. *C. R. Acad Sci Hebd Sciences Acad Sci D.* **269**, 1870-1873.
22. M. Yamada, *et al.*, 1990. Cloning and structure of human genomic DNA and hypothalamic cDNA encoding human prepro thyrotropin-releasing hormone. *Mol Endocrinol.* **4**, 551-556.
23. E.C.B. Griffiths, *et al.*, 1983. Thyrotropin-releasing hormone: An Introduction. In Thyrotropin releasing hormone. ed. NY, Raven Press. 1-14.
24. H. Akil, *et al.*, 1999. Neuroendocrine systems I. Overview thyroid and adrenal axes. In Fundamental Neuroscience. M. J. Zigmond, Bloom, F. E.
25. R. Guillemin, *et al.*, 2005. Hypothalamic hormones a.k.a hypothalamic releasing factors. *J. Endocrinol* **184**, 11-28.
26. E. Fliers, *et al.*, 1994. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing cells and fibers in the human hypothalamus. *J Comp Neurol* **350**, 311–323.
27. R.M. Lechan, *et al.*, 1982. Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* **111**, 55-65.
28. R.M. Lechan, *et al.*, 1986. Immunolocalization of the thyrotropin releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* **119**, 1210–1216.
29. T.P. Segerson, *et al.*, 1987. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* **238**, 78–80.
30. P. Joseph-Bravo, *et al.*, 2006. Integration of neuroendocrine signals that regulate the activity of hypophysiotropic peptides. *Molecular Endocrinology Research Signpost*, 1-24.
31. R.M. Sapolsky, *et al.*, 2000. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* **21**, 55-89.
32. T.K. Archer, *et al.*, 2007. Dynamic Histone Acetylation/Deacetylation with Progesterone Receptor-Mediated Transcription. *Molecular Endocrinology* **21** (4), 843–856.
33. CL. Smith, *et al.*, 2001. Steroid Hormone Receptor mediated Histone Deacetylation and Transcription at the Mouse Mammary Tumor Virus Promoter. *The journal of biological chemistry* **276** (35), 32423–32426.
34. R. Umezawa, *et al.*, 2009. Aberrant Histone Modifications at the Thyrotropin-Releasing Hormone Gene in Resistance to Thyroid Hormone: Analysis of F455S Mutant Thyroid Hormone Receptor. *Endocrinology* **150** (7), 3425-3432.
35. E. Yamamori, *et al.*, 2007. Molecular mechanisms for corticotropin-releasing hormone gene repression by glucocorticoid in BE(2)C neuronal cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology* **264**, 142–148.
36. A.J. Gallihier-Beckley, *et al.*, 2009. Emerging Roles of Glucocorticoid Receptor Phosphorylation in Modulating Glucocorticoid Hormone Action in Health and Disease. *Life*, **61** (10), 979–986.
37. N. Ismaili, *et al.*, 2004. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **1024**, 86-101.
38. I.M. Adcock, *et al.*, 2002. Molecular interactions between glucocorticoids and long-acting β 2-agonists. *J Allergy Clin Immunol* **110** (6), 261-268.
39. I. Rogatsky, *et al.*, 1998. Phosphorylation and inhibition of rat glucocorticoid receptor transcriptional activation by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *The journal of biological chemistry* **273** (23), 14315–14321.

40. D. Wang, *et al.*, 2009. Negative Regulation of TSH α Target Gene by Thyroid Hormone Involves Histone Acetylation and Corepressor Complex Dissociation. *Mol Endocrinol*, **23**(5), 600–609.
41. D. Wang, *et al.*, 2010. Distinct and Histone-Specific Modifications Mediate Positive versus Negative Transcriptional Regulation of TSH α Promoter. *PLoS ONE* **5** (3): e9853.
42. A. Cote-Vélez, *et al.*, 2011. Creb and Sp/Krüppel response elements cooperate to control rat TRH gene transcription in response to cAMP. *Biochimica et Biophysica Acta* **1809**, 191–199.
43. T. Haske, *et al.*, 1994. Phosphorylation of immunopurified rat liver glucocorticoid receptor by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol. Cell Biochem.* **132**,163–171.
44. J.C. Webster, *et al.*, 1997. Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein. *J Biol Chem* **272**, 9287–9293.
45. N. Popovic, *et al.*, 2010. Site-specific and dose-dependent effects of glucocorticoid receptor phosphorylation in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Steroids* **75**, 457–465.
46. G. Bour, *et al.*, 2007. Protein kinases and the proteasome join in the combinatorial control of transcription by nuclear retinoic acid receptors. *Trends Cell Biol* **17**, 301–309.
47. K.H. Kinyamu, *et al.*, 2007. Proteasome activity modulates chromatin modifications and RNA polymerase II phosphorylation to enhance glucocorticoid receptor-mediated transcription. *Mol Cell Biol* **27**, 4891–4904.
48. Z. Wang, *et al.*, 2002. Deciphering the Phosphorylation “Code” of the Glucocorticoid Receptor *in Vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* **277** (29), 26573–26580.
49. A. Cote-Vélez, *et al.*, 2008. The PKC and ERK/MAPK Pathways Regulate Glucocorticoid Action on TRH Transcription. *Neurochem Res* **33**, 1582–1591.
50. S. David, *et al.*, 2005. Serum/glucocorticoid-inducible kinase can phosphorylate the cyclic AMP response element binding protein, CREB. *FEBS Letters* **579**, 1534-1538.
51. F.L. Groeneweg, *et al.*, 2012. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* **350**, 299–309.
52. D.L. Swope, *et al.*, 1996. CREB-binding Protein Activates Transcription through Multiple Domains. *The Journal of Biological Chemistry* **271** (45), 28138–28145.
53. P.R. Manna, *et al.*, 2007. Crosstalk of CREB and Fos/Jun on a single cis-element: transcriptional repression of the steroidogenic acute regulatory protein gene. *Journal of Molecular Endocrinology* **39**, 261–277.
54. C. Maier, *et al.*, 2005. G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *Journal of Cell Science* **118**, 3353-3361.
55. R. Kumar, *et al.*, 2008. Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics: Targets & Therapy* **2** (4), 845–854.
56. A.J. Galliher-Beckley, *et al.*, 2011. Ligand-independent phosphorylation of the glucocorticoid receptor integrates cellular stress pathways with nuclear receptor signaling. *Mol Cell Biol.* **31** (23), 4663-75.
57. E. Imai, *et al.*, 1993. Glucocorticoid receptor-cAMP response elementbinding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. *J Biol Chem* **268**, 5353-5356.
58. M. Schena, *et al.*, 1989. Mutations in the glucocorticoid receptor zinc finger region that distinguish interdigitated DNA binding and transcriptional enhancement activities. *Genes Dev* **3**, 1590-1601.
59. MAA. Van Tilborg, *et al.*, 2000. Mutations in the glucocorticoid receptor DNA-binding domain mimic an allosteric effect of DNA. *J Mol Biol* **301**(4), 947-958.
60. H. Yong, *et al.*, 1999. Feedback Regulation of Thyrotropin-Releasing Hormone Gene Expression by Thyroid Hormone in the Caudal Raphe Nuclei in Rats. *Endocrinology* **140** (1), 43-49.
61. J. Liden, *et al.*, 1997. A new function for the C-terminal zinc finger of the glucocorticoid receptor. Repression of RelA transactivation. *J Biol Chem* **272**, 21467-72.

62. P. Joseph-Bravo, *et al.*, 2002. An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain research protocols* **9** (2), 93-104.
63. C. Gilbert, *et al.*, 2002. Immunoblotting and sequential lysis protocols for the analysis of tyrosine phosphorylation-dependent signaling. *Journal of Immunological Methods* **271**, 185-201.
64. M.M. Bradford, *et al.*, 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.
65. Gabriela Zárraga Granados, 2008. Modificaciones postraduccionales del receptor nuclear Nur77. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
66. R. Margueron, *et al.*, 2010. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Reviews Genetics* **11**, 285-296.
67. M. Morimoto, *et al.*, 1996. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain" an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neuroscience Research* **26**, 235-269.
68. C. Kim, *et al.*, 2005. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1 α) subunits of PKA. *Science* **307**, 690-696.
69. C. Hyeon, *et al.*, 2009. Ligand-induced global transitions in the catalytic domain of protein kinase A. *PNAS* **106** (9), 3023-3028.
70. R. Uribe, *et al.*, 2011. The systemic inhibition of nitric oxide production rapidly regulates TRH mRNA concentration in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and serum TSH concentration. Studies in control and cold-stressed rats. *Brain Res.* **1367**, 188-197.
71. Jaimes-Hoy L, *et al.*, 2008. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm and Behav* **53** (2), 366-377.
72. Osterlund C, *et al.*, 2011. Corticosterone pretreatment suppresses stress-induced hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity via multiple actions that vary with time, site of action, and de novo protein synthesis. *J Endocrinol* **208**, 311-322.

Anexo 1

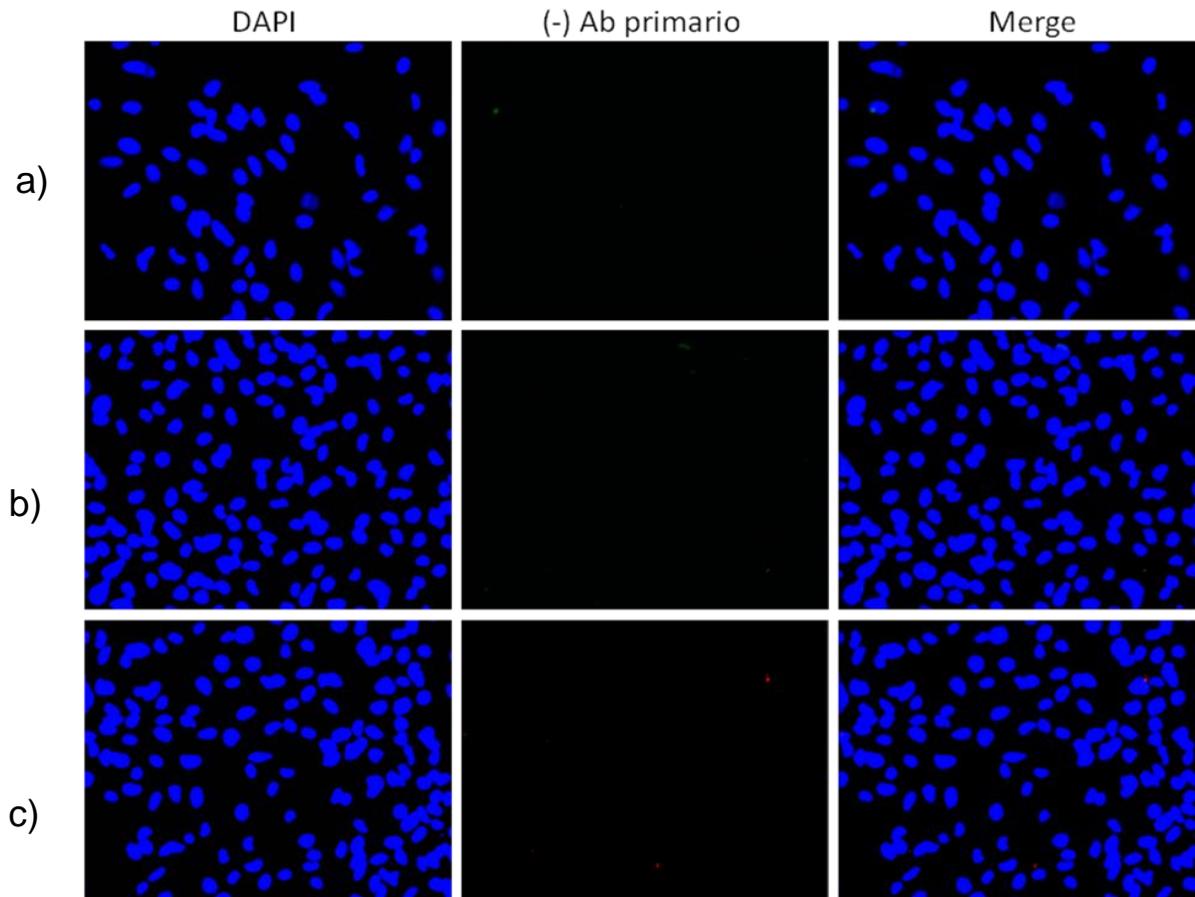


Figura 22. Inmunocitoquímica sin anticuerpos primarios en células hipotalámicas en situación control por 45 min para ver la especificidad de los anticuerpos secundarios fluorescentes. Se uso DAPI para marcar los núcleos. El anticuerpo secundario Chromeo 488 Goat anti-Rabbit IgG utilizado en **a)** experimento de pCREB y **b)** experimento de GR. El anticuerpo secundario Chromeo 546 Goat anti-Rabbit IgG **c)** experimento de PKAcat. (n=2)

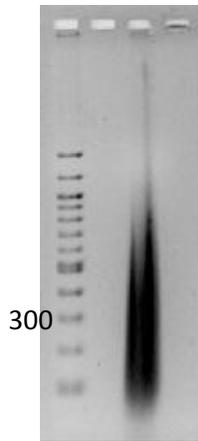


Figura 23. Fragmentos de DNA de ~300 pb para realizar la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) obtenido de los cultivos primarios hipotalámicos sonificado con 30 pulsos de 20 segundos. Gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio. El marcador 100 bp DNA Ladder.

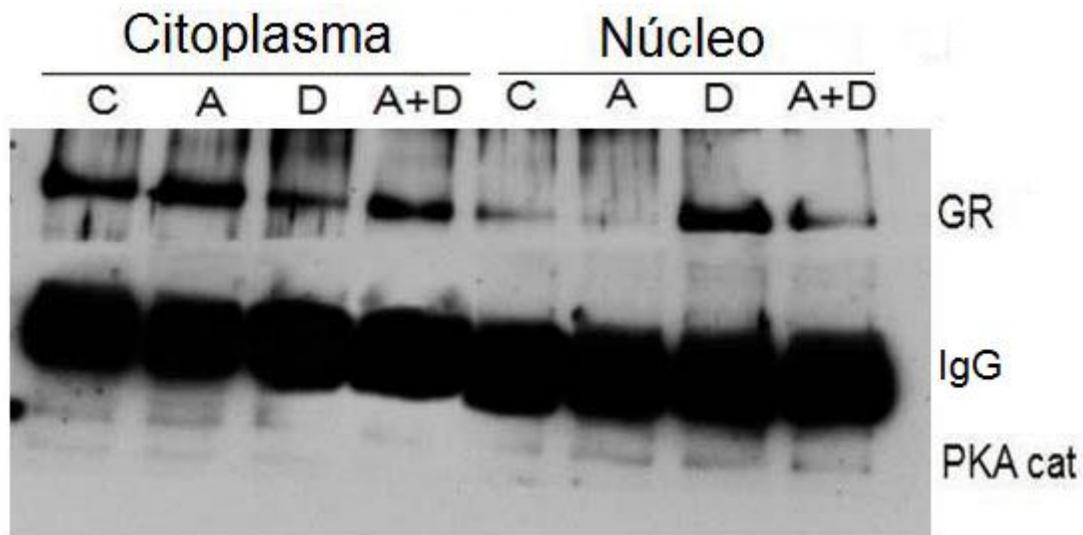


Figura 24. Inmunoprecipitación de PKAcat en extractos citoplasmáticos y nucleares de células hipotalámicas estimuladas por 1 hora en situación Control (C), AMPc (A) [1×10^{-3} M], Dex (D) [1×10^{-8} M] y combinados (A+D). La inmunoprecipitación de los extractos citoplasmáticos y nucleares fue revelado por inmunoblot utilizando los anticuerpos PKAcat (40 kDa) y GR (95 kDa). Se utilizó el IgG de conejo como control de carga.

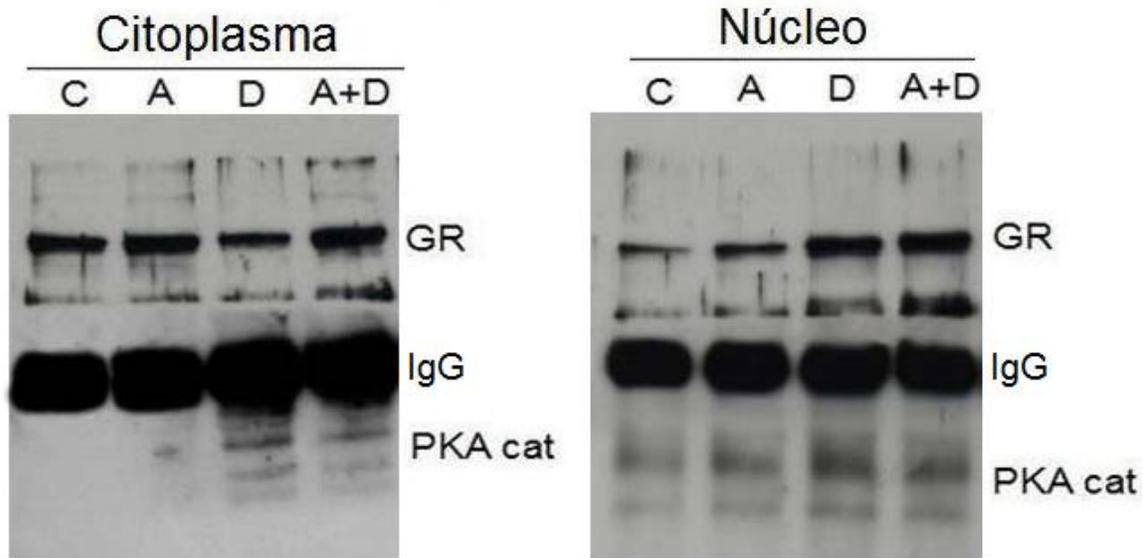


Figura 25. Inmunoprecipitación de GR en extractos citoplasmáticos y nucleares de células hipotalámicas estimuladas por 1 hora en situación Control (C), AMPc (A) [1×10^{-3} M], Dex (D) [1×10^{-8} M] y combinados (A+D). La inmunoprecipitación de los extractos citoplasmáticos y nucleares fue revelado por inmunoblot utilizando los anticuerpos de GR (95 kDa) y PKAcat (40 kDa). Se utilizó el IgG de conejo como control de carga.

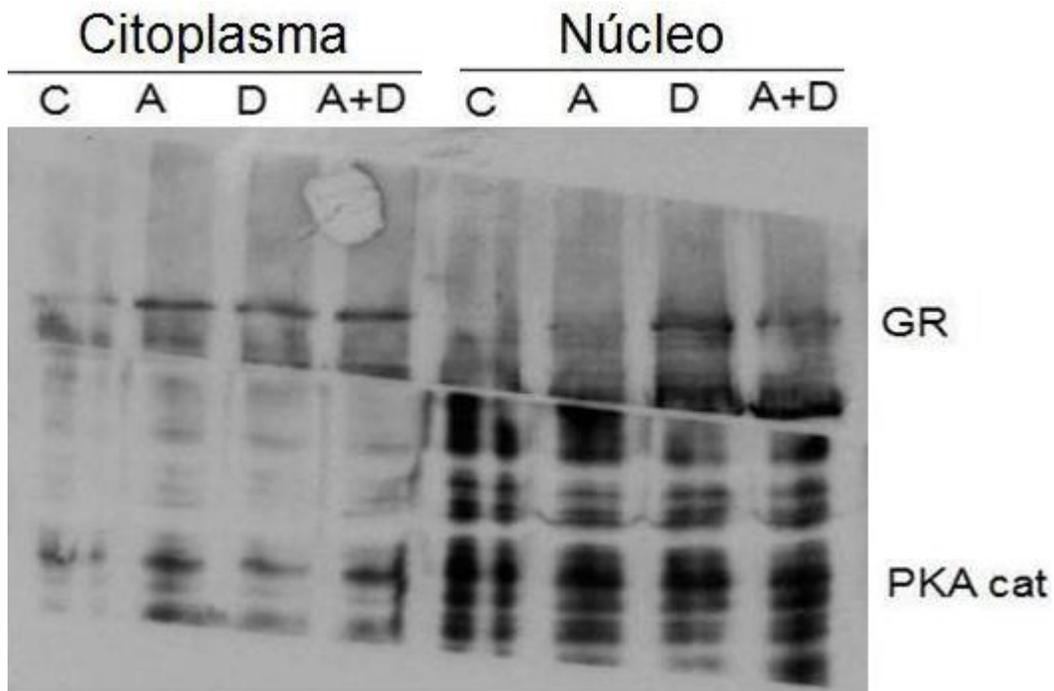


Figura 26. Niveles de GR y PKAcat en cultivos primarios hipotalámicos. Extractos citoplasmáticos y nucleares estimuladas por 1 hora en situación Control (C), Forskolina (F) [1×10^{-5} M], Dex (D) [1×10^{-8} M] y combinados (F+D) fueron analizados por ensayos de inmunoblot. En el inmunoblot se utilizaron los anticuerpos de GR (95 kDa) y PKAcat (40 kDa).

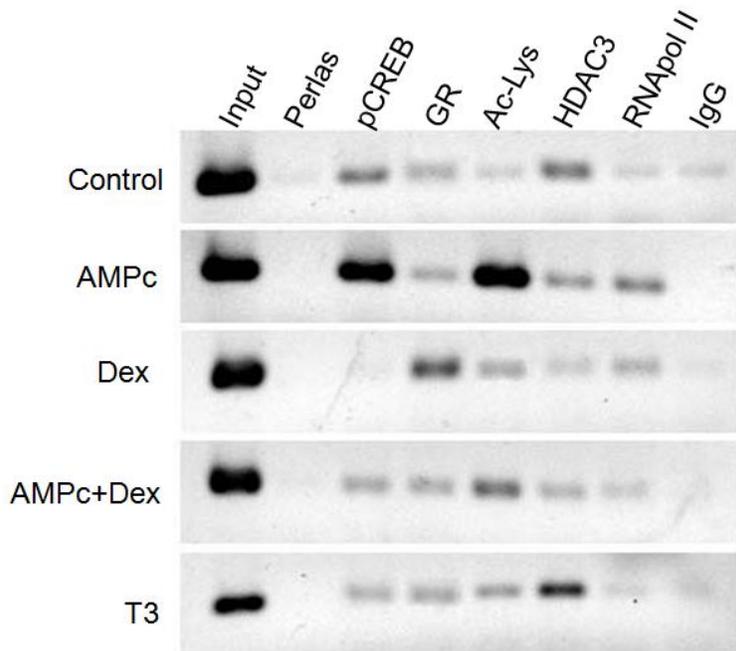


Figura 27. Imagen del Gel 1 del ChIP 1 de células hipotalámicas estimuladas por 1 hr con AMPc [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], combinados (AMPc+Dex) y T3 [1×10^{-8} M]. Se utiliza como control positivo el input y como negativo las esferas A/G de agarosa (perlas) sin el anticuerpo primario y el IgG de conejo.

	Input	Perlas	pCREB	GR	Ac-Lys	HDAC 3	RNAPol II	IgG
Control	9.4180998	0.2476101	2.6456141	1.5442558	0.5876769	3.1227942	0.4751747	0.5215068
AMPc	8.8244636	-0.12565	8.2537915	1.2558121	8.7705336	1.7471637	2.5637933	0.0492507
Dex	8.974679	-0.140248	0.3695307	4.2955282	1.5427596	0.8935464	1.4036152	0.2925456
AMPc+Dex	8.6584581	0.0853282	1.5505565	1.4371753	3.1450017	1.2973853	0.8579269	0.2150172
T3	6.2459526	-0.347653	1.3355791	1.6622964	1.4666136	4.0026924	0.4011849	0.4526372

Figura 28. Cuantificación del Gel 1 de la PCR semicuantitativa del ChIP 1 por Quality One 4.2.1.

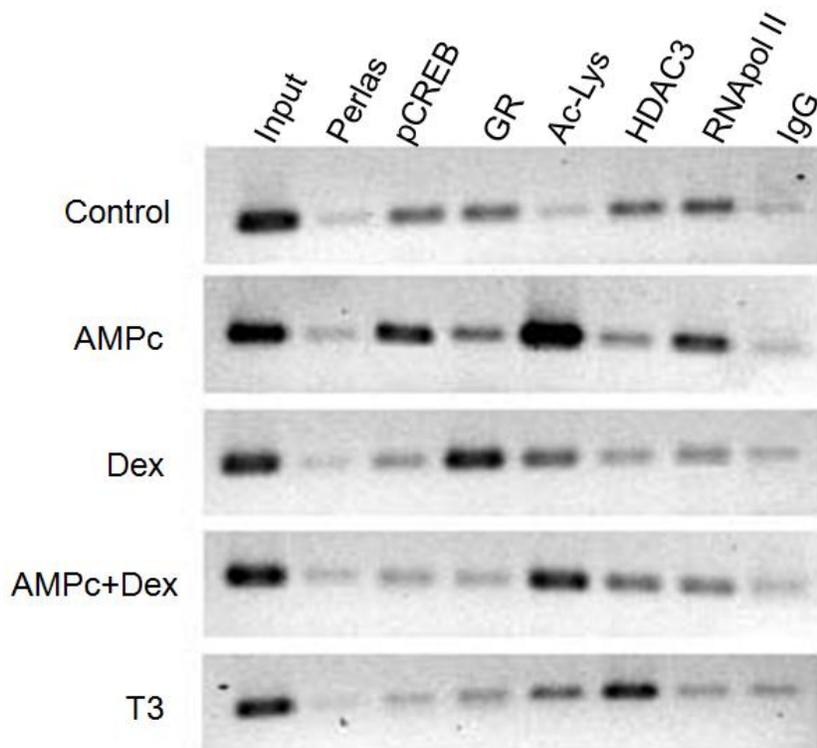


Figura 29. Imagen del Gel 2 del ChIP 2 de células hipotalámicas estimuladas por 1 hr con AMPc [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], combinados (AMPc+Dex) y T3 [1×10^{-8} M]. Se utiliza como control positivo el input y como negativo las esferas A/G de agarosa (perlas) sin el anticuerpo primario y el IgG de conejo.

	Input	Perlas	pCREB	GR	Ac-Lys	HDAC 3	RNApol II	IgG
Control	5.5449987	0.7244501	2.7459087	2.8348629	0.728563	2.5511024	2.7662183	0.4572689
AMPc	5.5117764	0.9454963	5.206431	2.4549108	5.9876013	1.9806482	4.1615547	0.7967293
Dex	4.8603069	0.6303628	1.648202	5.0850516	3.1047223	1.4004377	1.9391044	0.8400267
AMPc+Dex	5.4554388	0.9009874	1.3436218	1.1030312	4.9946309	2.7375235	2.4186915	0.8964918
T3	4.5792247	0.3425212	0.8111405	1.230564	2.1987611	4.0787222	0.9859242	1.0159901

Figura 30. Cuantificación del Gel 2 de la PCR semicuantitativa del ChIP 2 por Quality One 4.2.1.

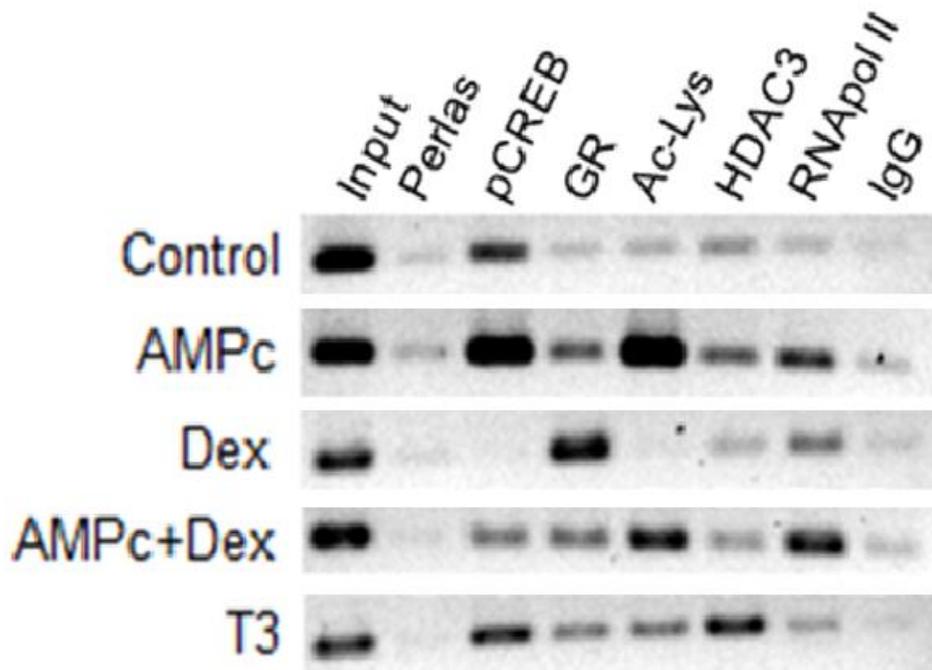


Figura 31. Imagen del Gel 3 del ChIP 3 de células hipotalámicas estimuladas por 1 hr con AMPc [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], combinados (AMPc+Dex) y T3 [1×10^{-8} M]. Se utiliza como control positivo el input y como negativo las esferas A/G de agarosa (perlas) sin el anticuerpo primario y el IgG de conejo.

	Input	Perlas	pCREB	GR	Ac-Lys	HDAC 3	RNAPol II	IgG
Control	6.3712589	0.4254173	3.5800675	0.747803	0.9474484	1.6463012	0.8089438	0.2631409
AMPc	6.0796678	0.9443539	6.5089196	2.7754373	6.8356292	2.6279304	3.7729143	0.8719909
Dex	4.7919594	0.4041671	0.1950036	5.5995904	-0.054061	1.0869846	2.4013717	0.5173527
AMPc+Dex	5.5647532	0.2312005	2.289921	2.5218717	4.8064944	1.6200444	4.935856	0.9268181
T3	3.7425784	0.2076631	3.5903358	1.8710313	1.9843575	3.7615676	1.1248694	0.1710443

Figura 32. Cuantificación del Gel 3 de la PCR semicuantitativa del ChIP 3 por Quality One 4.2.1.

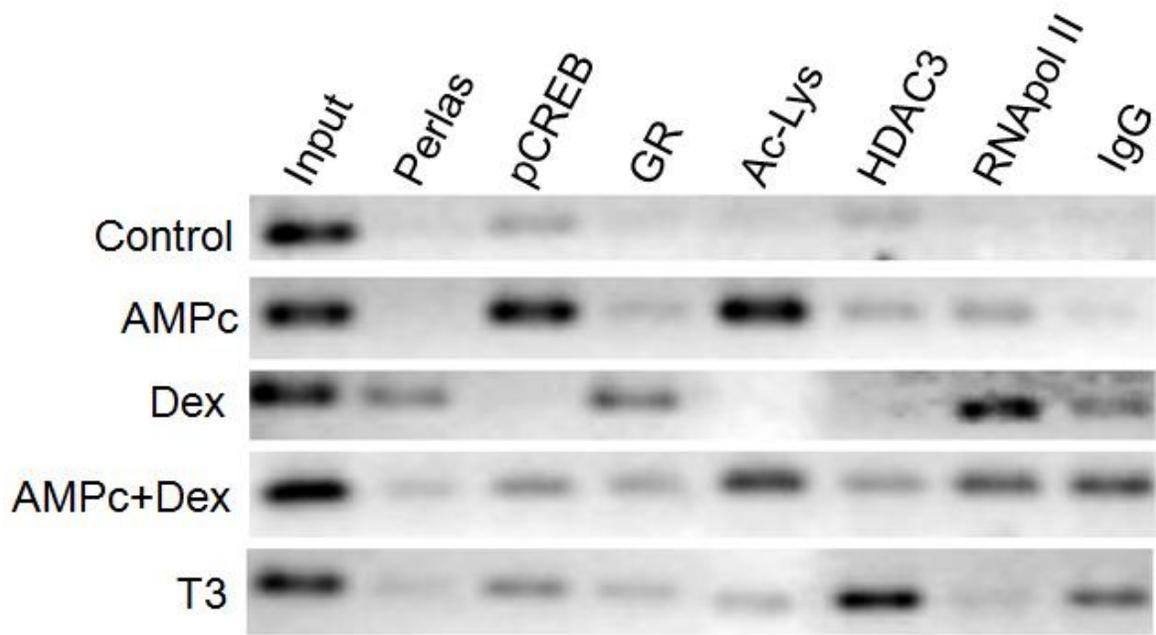


Figura 33. Imagen del Gel 4 del ChIP 4 de células hipotálamicas estimuladas por 1 hr con AMPc [1×10^{-3} M], Dex [1×10^{-8} M], combinados (AMPc+Dex) y T3 [1×10^{-8} M]. Se utiliza como control positivo el input y como negativo las esferas A/G de agarosa (perlas) sin el anticuerpo primario y el IgG de conejo.

Anexo 2

1. Luria Bertani (1 L)

- Bacto triptona 10 g
- Bacto extracto de levadura 5 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 10 g
- Ajustar el pH a 7.0

2. Solución Hank's (0.5 L)

- Cloruro de sodio (NaCl) 4 g
- Cloruro de potasio (KCL) 0.2 g
- Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.2 g
- Fosfato de sodio (NaH₂PO₄) 0.045 g
- D-(+)-glucosa 0.5 g
- Ajustar el pH a 7.4

3. PBS 1X (1 L)

- Cloruro de potasio (KCL) 0.2 g
- Fosfato de potasio (KH₂PO₄) 0.195 g
- Cloruro de sodio (NaCl) 8.12 g
- Fosfato de sodio (NaH₂PO₄) 0.97 g
- Ajustar el pH a 7.2

4. Poli-D-lisina

- Al frasco de 5 mg agregar 1 ml de agua estéril grado cultivo, agitar y hacer alícuotas. Guardar a -20 °C hasta su uso

5. DMEM (0.5 L)

- Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 3.7 g
- Ajustar el pH a 7

6. Solución de formaldehído al 11%

- Fromaldehído al 11%
- 0.1 M NaCl
- 1 mM EDTA
- 0.5 mM EGTA
- 50 mM Hepes

7. Buffer de Glicina (2.5 M)

- Agregar 18.7675 g de glicina a 100 ml de agua MiliQ

8. Buffer de Lisis

- 1 % SDS
- 5 mM EDTA
- 50 mM de Tris-HCl pH 8.1
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasas y desacetilasas

9. Buffer de dilución

- 1 % de Tritón X-100
- 2 mM de EDTA
- 20 mM Tris-HCl pH 8.1

- 150 mM de NaCl
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

10. Solución de lavado de perlas

- 0.1 M Bicarbonato de sodio (NaHCO₃)
- 1 % SDS
- Resuspender en agua
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

11. Buffer Paro I

- 0.1 % SDS
- 1 % Tritón X-100
- 2 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl pH 8.1
- 150 mM NaCl
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

12. Buffer Paro II

- 0.1 % SDS
- 1 % Tritón X-100
- 2 mM EDTA
- 20 mM Tris-HCl pH 8.1
- 500 mM NaCl
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

13. Buffer Paro III

- 0.25 M LiCl
- 1 % NP40
- 1 % Deoxicolato
- 1 EDTA
- 10 mM Tris-HCl pH 8.1
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

14. Buffer TE

- 10 mM Tris-Cl, pH 7.5
- 1 mM EDTA
- Agregar antes de usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

15. Sample Buffer 1X:

- 125 mM Tris-HCl, pH 6.8
- 8% SDS
- 10% β-mercaptoetanol
- 17.5% glicerol
- Usar inhibidores: proteasas, fosfatasa y desacetilasa

16. Buffer de corrida (1 L)

- 100ml de Tris-Gli 10X
- 10 ml de SDS 10 %
- 890 ml de H₂O

17. Buffer de transferencia (1 L)

- 100 ml de Tris-Gli 10X
- 200 ml de MeOH
- 700 ml de H₂O

18. Paraformaldehído 4%

- 4 ml de PBS 1X
- 0.4 g PFA
- Calentar a 60-70 °C en campana
- Aforar a 10 ml con PBS 1X

19. Inhibidores

- 1X Complete ("protease inhibitor cocktail tablets", 50X en 1 ml)
- 1 mM Orvanadato (Na_3VO_4)
- 10 mM Cloruro de sodio (NaF)
- 10 mM Butirato de sodio