

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**CARACTERIZACION DEL PRECURSOR BIOSINTETICO
DEL FACTOR LIBERADOR DE LA HORMONA
LUTEINIZANTE (LHRH)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A:

SUSANA COHEN CORY



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.

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| A. REGULACION NEUROENDOCRINA | 1 |
| B. GENERALIDADES SOBRE LA HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LHRH) | 2 |
| C. BIOSINTESIS DE LA LHRH | 3 |
| D. BIOSINTESIS DE NEUROPEPTIDOS | 6 |
| D.1. Antecedentes | 6 |
| D.2. Biosíntesis de hormonas hipotalámicas de liberación | 9 |
| E. ENFOQUE EXPERIMENTAL | 11 |
| II. OBJETIVOS | 14 |
| III. METODOLOGIA | 16 |
| A. OBTENCION DE ARN | 16 |
| A.1. Obtención de polisomas de hipotálamo de rata | 16 |
| A.2. Extracción de ARN | 17 |
| A.2.1. método de Guanidina-HCl | 17 |
| A.2.2 método de Tiocianato de Guanidina- gradiente de Cloruro de Cesio | 18 |
| A.3. Purificación de la fracción poli(A) del ARN | 20 |
| A.3.1. Cromatografía de afinidad en Oligo- dT celulosa | 20 |
| A.3.2. Cromatografía de afinidad en Poly(U) Sephadex | 21 |
| B. SISTEMAS DE TRADUCCION | 22 |
| B.1. Sistema libre de células de reticulo- cito de conejo | 22 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| B.1.1. Preparación del lisado de reticulocito de conejo | 22 |
| B.1.2. Tratamiento del lisado con nucleasa micrococcal | 23 |
| B.1.3 Evaluación de la actividad de traducción del ARN mensajero | 23 |
| B.1.4 Determinación de incorporación de marca | 24 |
| B.2. Extracto de germen de trigo | 25 |
| B.2.1. Enriquecimiento del germen de trigo | 25 |
| B.2.2. Preparación del extracto de germen de trigo | 25 |
| B.2.3. Tratamiento con nucleasa micrococcal | 26 |
| B.2.4. Componentes del ensayo de traducción | 27 |
| B.2.5. Incorporación de marca a proteína total | 28 |
| C. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS | 30 |
| C.1. Preparación del gel de poliacrilamida | 30 |
| C.2. Tratamiento del gel para fluorografía | 31 |
| D. INMUNOPRECIPITACION DE PRODUCTOS DE TRADUCCION | 32 |
| IV. RESULTADOS | 33 |
| A. OPTIMIZACION METODOLOGICA | 33 |
| A.1. Obtención de ARNm.- Rendimiento y titulación | 33 |
| A.2. Lisado de reticulocito de conejo y extracto de germen de trigo como sistemas de traducción | 34 |
| A.2.1. Análisis electroforético de los productos de traducción | 35 |
| A.2.2. Requisitos del sistema de traducción | 36 |
| A.3. Inmunoprecipitación | 36 |
| B. CARACTERIZACION DEL PESO MOLECULAR | |

| | |
|----------------------------------------------------------------|----|
| DEL PRECURSOR DE LHRH | 37 |
| B.1. Reconocimiento de una señal in- munoprecipitable | 37 |
| B.2. Determinación del peso molecular del precursor de LHRH | 38 |
| V. DISCUSION DE RESULTADOS | 67 |
| VI. APENDICES | 70 |
| A. ABREVIATURAS | 70 |
| B. REACTIVOS | 72 |
| C. EQUIPO | 74 |
| VII. REFERENCIAS | 75 |

I. INTRODUCCION

A. REGULACION NEUROENDOCRINA.

El hipotálamo es una de las estructuras que constituyen el diencéfalo, en el cerebro, y que a pesar de su pequeño tamaño tiene un papel muy importante en la homeostasis, la regulación neuroendócrina, y la reproducción.

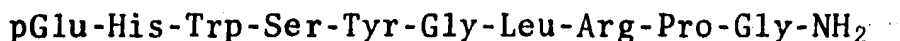
Los cuerpos celulares de las neuronas que constituyen el hipotálamo están agrupados en núcleos que van desde el quiasma óptico hasta los cuerpos mamilares. Las terminaciones nerviosas de estos núcleos están localizadas en su mayoría en la eminencia media, a excepción de los núcleos supraóptico y para ventricular que tienen parte de sus terminaciones en la hipófisis posterior o neurohipófisis (1).

En 1949 se postuló que el hipotálamo ejerce el control neurohormonal sobre la adenohipófisis o hipófisis anterior, liberando sustancias químicas transmisoras las cuales son específicas para cada hormona adenohipofisiaria (2). Estos neuropéptidos o "factores hipotalámicos de liberación" son sintetizados en el soma de las células neurosecretoras del hipotálamo, son transportados por el axón hasta la terminal nerviosa, concentradas en la eminencia media, de donde son vertidos a un sistema porta vascular que va de la eminencia media a la hipófisis anterior

una vez que han alcanzado su célula blanco ejercen su función regulatoria en la liberación de la hormona adenohipofisiaria correspondiente (3). Los primeros tres factores hipotalámicos que fueron identificados y de los cuales ha sido determinada su estructura son: la Hormona Liberadora de la Tirotropina o TRH ("Thyrotropin Releasing Hormone") (4,5,6); la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante y de la Folículo Estimulante o LHRH ("Luteinizing Hormone Releasing Hormone") (7); y la Somatostatina o Factor Inhibidor de la Liberación de la Somatotropina o SRIF ("Somatostatin Release Inhibiting Factor") (8, 9). Estudios más recientes han logrado la identificación del Factor Liberador de la Corticotropina o CRF ("Corticotropin Releasing Factor") (10) y del Factor Liberador de la Hormona del Crecimiento o GRF ("Growth Hormone Releasing Factor") (11,12).

B. GENERALIDADES SOBRE LA HORMONA LIBERADORA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LHRH).

La existencia de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (LHRH) fue postulada al observar que existía cierta actividad en extractos de hipotálamo capaz de estimular la liberación de la Hormona Luteinizante (LH) (13). Posteriormente fue posible aislar esta hormona de hipotálamo de porcinos, con lo que se hizo posible demostrar en 1971, que la LHRH es un de capéptido con ambas terminaciones bloqueadas, cuya secuencia es:



(14). Gracias a la creación de anticuerpos específicos contra la hormona, se han podido realizar estudios sobre su distribución regional y subcelular. Por técnicas de fraccionamiento subcelular se ha demostrado que la mayor parte de la LHRH se en encuentra concentrada a nivel de terminaciones nerviosas (15). Mediante inmunoensayos de micro-disecciones se ha determinado que las concentraciones más altas de la LHRH se encuentran en la eminencia media, núcleo arcuato, organum vasculosum de la lámina terminalis, y la región preóptico supraquiasmática (16). Se ha determinado que las terminaciones nerviosas de la eminencia me-- dia contienen una alta cantidad de la LHRH, y que los cuerpos -

neuronales están concentrados en las regiones preóptico supra quiasmática en casi todas las especies animales, y además en el núcleo arcuato en la rata (17). Se ha reportado la presencia de péptidos con actividad liberadora de la Hormona Luteinizante, e inmunoreactivos a anticuerpos anti-LHRH en placenta (18), ovario (19), y testículo (20), en varias especies animales. Sin embargo, no se conoce el papel que juega esta hormona en estos tejidos.

Hasta ahora poco es lo que se conoce sobre la regulación de la LHRH, sin embargo se ha llegado a observar que ciertos neurotransmisores, en particular las aminas biogénicas, regulan su liberación. Ciertas evidencias demuestran que al dopamina ejerce un efecto estimulador sobre la liberación de la LHRH (21), pero aún existen controversias sobre si el efecto de este neurotransmisor sobre la neurona LHRHérgica es inhibitorio o estimulatorio. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en el estado hormonal del animal en el momento del estudio, o a la dosis empleada que afecte diferencialmente a subclases de receptores a dopamina. A pesar de existir evidencias que implican que la serotonina (22), norepinefrina (23), histamina (24) y melatonina (25) están involucradas en el control de la LHRH, no se conoce a que nivel es el efecto de estos neurotransmisores sobre la neurona LHRHérgica. Otros estudios (26) han conducido a la hipótesis de que las catecolaminas modulan la liberación tónica pulsátil de la LHRH hacia el sistema porta vascular, y de que a su vez están involucradas en el efecto retroinhibitorio de los esteroides gonadales sobre el hipotálamo.

Se ha observado que los esteroides gonadales juegan un papel muy importante en la regulación de la LHRH, pudiendo ser su acción directamente sobre la neurona peptidérgica o a nivel de liberación de neurotransmisores que a su vez modulen la liberación de la LHRH. El mecanismo de acción de los esteroides sexuales puede ser por retroalimentación positiva o negativa (27), lo cual va a depender del esteroide y de las condiciones fisiológicas del individuo. Se postula que la liberación de la LHRH de otras áreas del cerebro (además de la eminencia media) es también influenciada por esteroides gonadales (28).

Una de las funciones de la LHRH es ejercer el control neuroendócrino del sistema hipotálamo-hipofisiario-gonadal. Mediante estudios con la LHRH sintética se ha podido observar que esta neurohormona es capaz de liberar la LH y la FSH tanto *in vivo* como *in vitro* en todas las especies estudiadas, incluso en el hombre (29). En el caso de la LH la liberación es dosis dependiente, mientras que para la FSH la intensidad de respuesta es menor y no depende de la dosis administrada. La acción de la LHRH sobre la adenohipófisis es exclusivamente sobre las células gonadótropas liberando la LH y la FSH. Este efecto *in vivo* es inmediato y rápidamente reversible. Se ha postulado que la liberación de gonadotropinas es causada por interacción de la LHRH con receptores localizados en la membrana plasmática y parece ser que sus efectos son mediados por AMP cíclico y/o por cambio en la permeabilidad de los iones (30). Una vez liberadas la LH y FSH de la hipófisis anterior pasan a circulación para ser transportadas hasta su órgano blanco en donde ejercen el control de la liberación de los esteroides gonadales. De esta forma la LHRH controla indirectamente los procesos fisiológicos en los que se involucra la síntesis-secreción de hormonas sexuales.

La variación en los niveles de la LHRH en ciertas condiciones fisiológicas está altamente relacionada con procesos sexuales como son la diferenciación sexual, la pubertad, el ciclo menstrual y la reproducción. Durante el desarrollo normal del individuo, desde la vida fetal hasta la edad adulta en que las mujeres presentan la menopausia, los niveles de LHRH varían grandemente según la etapa del crecimiento: se encuentran altos durante la vida fetal temprana, bajando a un nivel basal durante la niñez, para posteriormente aumentar gradualmente y en forma pulsátil durante la pubertad, hasta alcanzar los niveles normales en el adulto (31). El cambio hormonal durante la época de desarrollo sexual parece estar mediado por un aumento en la sensibilidad de la adenohipófisis a la LHRH (32). Aún en la etapa adulta los niveles de la LHRH varían en ciertas condiciones: En la mujer, el control del ciclo ovárico está altamente relacionado con el aumento en la secreción de la LHRH. Durante el ciclo menstrual, el pico de estrógenos preovulatorio combinado a un aumento en la liberación de la LHRH desencadena los eventos que

llevan a la ovulación (33).

Además de ejercer el control neuroendócrino del sistema hipotálamo-hipofisiario- gonadal la LHRH juega un papel muy importante en el comportamiento sexual. Este neuropéptido es capaz de potenciar el reflejo de lordosis en roedores, lo cual es un elemento esencial en el comportamiento reproductivo en esta especie (34). El efecto de la LHRH sobre el comportamiento se atribuye a la acción neural de este péptido, que es independiente de su acción sobre la adenohipófisis (35). Las neuronas secretoras de la LHRH de la materia gris mesencefálica parecen estar involucradas en este fenómeno y sus axones parecen terminar fuera del hipotálamo (36). Estos datos, aunados a ciertos estudios neurofarmacológicos (37) y a evidencias de que la LHRH es capaz de modular la actividad eléctrica en neuronas del sistema nervioso central, sugieren que la LHRH puede actuar como neuromodulador además de como neurohormona (38).

C. BIOSÍNTESIS DE LA LHRH.

El conocimiento de la estructura de la LHRH ha dado un impulso a la investigación sobre su biosíntesis. Las primeras especulaciones sobre la biosíntesis de la LHRH sugerían, como para la TRH, un mecanismo de síntesis no ribosomal (39). Sin embargo, este péptido posee características comunes con muchos otros neuropéptidos sintetizados ribosomalmente, como la ciclización del residuo glutamina amino terminal y la amidación del aminoácido carboxi terminal. Estos datos condujeron a la suposición de un mecanismo de síntesis de la LHRH por vía ribosomal, en donde en precursor sería procesado hasta el péptido activo durante su viaje del soma a la terminal nerviosa.

Los estudios iniciales sobre la biosíntesis de la LHRH demostraron la existencia de formas inmunoreactivas de alto peso molecular en extractos de hipotálamo (40). Posteriormente R. Millar comprobó que mediante estudios cromatográficos de extractos de hipotálamo porcino y por detección por radioinmunoensayo con anticuerpos dirigidos contra la parte central del péptido, era posible determinar una especie inmunoreactiva

de más de 5,000 daltones de peso molecular. Este mismo estudio demostró que además de esta especie inmunoreactiva de alto peso molecular existía un péptido intermedio de 1,800 daltones, cuya identidad no ha sido totalmente explicada. A pesar de haber trabajado con una gran cantidad de tejido, la pequeña proporción en que la LHRH es sintetizada en el hipotálamo (menos del 0.1% de la proteína total) no permitió a estos autores el purificar el péptido inmunoreactivo o determinar su peso molecular. Trabajando con extractos de hipotálamo de rata, J.P. Gautron (41) fue capaz de determinar por inmunoensayos de ciertas fracciones cromatográficas, la existencia de un péptido reconocido por anticuerpos anti-LHRH de aparentemente 26,000 daltones de peso molecular, mientras que G. Fink reporta (42) que mediante estudios de traducción de ARN mensajero de hipotálamo de rata, e inmunoprecipitación de los productos de traducción marcados con (³H)-Leucina, con un anticuerpo obtenido en su laboratorio, se observa la presencia de un péptido inmunoreactivo de 28,000 daltones, el cual no es aparente al incorporar (³⁵S)-Metionina como marcador. Por otra parte, en base a lo que se conoce hasta el momento, P. Seeburg (comunicación personal) ha encontrado en placenta humana a partir de un banco de clonas de ADN complementario (ADNc), un ADNc que codifica para un péptido de 10,000 daltones que contiene en su interior la secuencia a la LHRH.

D. BIOSINTESIS DE NEUROPEPTIDOS.

D.1. Antecedentes.

Todos los mecanismos involucrados en la síntesis y procesamiento de neuropéptidos requieren de sistemas de regulación muy eficientes para dar lugar al péptido activo, que va a ser liberado de la terminal nerviosa como respuesta a un estímulo dado. El entendimiento de los mecanismos de biosíntesis de neuropéptidos es de suma importancia para conocer el nivel al que actúan los diversos estímulos sobre la neurona peptidérgica. Los estímulos sobre estas células podrían -

reflejar una estimulación de la biosíntesis del péptido, que posteriormente regresaría a un estado de equilibrio por acción de otros elementos regulatorios. Esto implicaría una acción a nivel de expresión genómica. Otra posibilidad de acción de los elementos regulatorios sería sobre la secreción del péptido, y el aumento en la síntesis sería sólo un reflejo de la restauración de los niveles normales del péptido almacenado. Un punto importante en el estudio de la biosíntesis de neuropéptidos es el poder elucidar la localización de las neuronas peptidérgicas; datos hasta ahora basados en la detección del péptido procesado.

Una amplia gama de proteínas de secreción y hormonas peptídicas son sintetizadas a partir de precursores de alto peso molecular, los cuales son procesados por enzimas proteolíticas dentro de compartimientos subcelulares (Retículo Endoplásmico Rugoso, Aparato de Golgi) y de vesículas de almacenaje o de secreción, para finalmente liberar el péptido biológicamente activo por exocitosis. La utilización de una serie de estrategias experimentales (experimentos de pulso y caza, técnicas de traducción en sistema libre de células, y técnicas de ADN recombinante) han llevado a la identificación de varias prohormonas neuropeptídicas como la pro-vasopresina, pro-encefalinas, pro-calcitonina, pro-somatostatina y pro-ACTH- β lipotropina (o pro-opiomelanocortina (POMC)) entre otras. En estos precursores las secuencias biológicamente activas se encuentran dentro de la cadena peptídica, usualmente formando una pequeña parte del precursor total. En algunos casos puede estar presente más de un producto biológicamente activo dentro de un polipéptido, como sucede para los precursores de ACTH y encefalinas. La formación de los productos peptídicos correctos requiere de sistemas de regulación eficientes a nivel de procesamiento post-traducción.

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de neuropéptidos fueron realizados por Sachs y colaboradores (43), quienes demostraron que en cultivos mixtos de hipotálamo y neurohipófisis se presentaba una incorporación de aminoácidos radioactivos a la molécula de vasopresina, a pesar de haber cierta degeneración del tejido. Estos autores sugirieron la síntesis de vasopresina en forma de prohormona, al identificar una molécula de alto

peso molecular que contenía la secuencia a neurofisininas. Estudios posteriores (44), en los que al inhibir la síntesis de ARN se obtenía un decaimiento en la síntesis de vasopresina, apoyaban la idea de la existencia de formas precursoras de las neurofisininas. Posteriormente, mediante estudios *in vivo* (45) se demostró que la vasopresina, la oxitocina y sus neurofisininas asociadas, son sintetizadas como parte de precursores de peso molecular de aproximadamente 20,000 daltones. Finalmente, al traducir ARN hipotalámico en sistema libre de células (46), se llegó a corroborar la existencia de la pre-proneurofisinina de peso molecular de 17,500 daltones, con lo que se han postulado varias posibilidades de modificación post-traducción del precursor, que explican la diferencia en peso molecular.

Se ha demostrado que las endorfinas, la Hormona Estimulante del Melanocito (MSH) y la Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) son sintetizadas en la adenohipófisis vía un precursor común de 30,000 daltones. En los primeros estudios sobre la biosíntesis de ACTH (47) se reportó la presencia de una forma inmunoreactiva de alto peso molecular al usar cromatografía en gel, y posteriormente fue demostrada la función de esta molécula -- como precursor biosintético de ACTH (48). Estudios posteriores de síntesis del precursor en sistema libre de células, demostraron que este precursor contenía la secuencia de la ACTH y además codificaba para la β -endorfina. La estructura total del precursor de ACTH y β -endorfina fue identificada basándose en la secuencia nucleotídica del ADN complementario producido a partir de ARNm de hipófisis. Se ha observado que no obstante que las moléculas de Pro-opiomelanocortina (POMC) sintetizadas en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis son idénticas, el procesamiento es distinto en estas dos regiones (50). Los principales productos sintetizados o procesados en el lóbulo anterior son el ACTH tanto en su forma glicosilada como no glicosilada, y la β -lipotropina, mientras que en el lóbulo intermedio se producen principalmente la Hormona Estimulante del Melanocito (MSH) y el Péptido del Lóbulo Intermedio Tipo Corticotropina (CLIP) y la β -endorfina en su forma glicosilada. Aún no se ha determinado con claridad cuáles son los factores que provocan el procesamiento diferencial de este precursor, pero se ha --

observado que los pares de residuos de aminoácidos básicos - (Arg-Arg, Lys-Arg, Lys-Lys) en donde se llevan a cabo los - cortes enzimáticos, tienen un papel muy importante en el procesamiento, así como ciertas modificaciones post-traduccion como son la glicosilación y la acetilación.

D.2. Biosíntesis de Hormonas Hipotalámicas de Liberación.

Por más de una década una gran variedad de trabajos se han enfocado al estudio del mecanismo de biosíntesis de péptidos - hipotalámicos de liberación. En un principio se postularon dos posibles mecanismos de biosíntesis de péptidos hipotalámicos. En vista de que muchos de los péptidos pequeños biológicamente activos como la glutatona (51) y varios antibióticos peptídicos (52) son sintetizados enzimáticamente en ausencia de ARN - mensajero, la mayoría de los estudios trataron de demostrar un mecanismo de biosíntesis no ribosomal. Alternativamente, estos péptidos podrían ser sintetizados por la vía convencional en ribosomas, en forma de péptidos precursores (prohormonas) que serían procesados enzimáticamente para dar lugar a la hormona biológicamente activa.

Los primeros estudios sobre la biosíntesis de TRH (53) de mostraron que al incubar precursores de aminoácidos radioactivos con fragmentos de hipotálamo de rata, estos se incorporaban a péptidos con las mismas propiedades electroforéticas y cromatográficas de la TRH. Posteriormente estos estudios fueron altamente criticados (54) poniendo en evidencia que era necesario una purificación más extensiva de la TRH para poder llegar a una conclusión sobre su biosíntesis. Otros autores (39) postularon un mecanismo enzimático de síntesis de la TRH, independiente de síntesis por ribosomas, pero posteriormente se demostró (55) que al incubar homogenados de hipotálamo con -- aminoácidos radioactivos en presencia de inhibidores de síntesis de proteínas o en presencia de ribonucleasas, había un decremento en la síntesis de TRH. Estos datos sugirieron que este péptido es sintetizado vía un precursor de alto peso molecular, en analogía a otros péptidos como la neurofisiña, - sin embargo ninguno de estos estudios llevaron a la identifi

cación de un mecanismo de síntesis de la TRH. Mediante técnicas de ADN recombinante ha sido posible encontrar un ADN complementario a un fragmento de ARNm de piel de *Xenopus laevis*, que codifica para cuatro moléculas de la TRH (56), flanqueadas por pares de residuos de aminoácidos básicos. Esto pone en evidencia que la TRH se sintetiza vía un precursor de alto peso molecular, en donde esta hormona se presenta en multicopia.

Varios estudios han puesto en evidencia más claramente que la Somatostatina es sintetizada vía un precursor de alto peso molecular. Mediante estudios de filtración en gel de extractos de hipotálamo (57) fue posible identificar formas inmunoreactivas de Somatostatina de alto peso molecular. A partir de isletas de Langherhans de páncreas de pescado fue posible identificar un ARNm que codifica para un precursor de Somatostatina de 12,000 daltones (58). Posteriormente se puso en evidencia la existencia de un precursor de 15,000 daltones al traducir ARNm de hipotálamo de ratón y al determinar por hibridación con ADN específico para Somatostatina, que el ARNm que codifica para este neuropéptido contiene aproximadamente 550 bases, lo que confirma observaciones anteriores (59). Por técnicas de ADN recombinante se ha podido aislar de páncreas de pescado un ADNc que codifica para Somatostatina (60), con lo que se ha elucidado la secuencia total del precursor y se han realizado varios estudios sobre su biosíntesis (61). Debido a la proporción tan baja en que es sintetizada la Somatostatina en el hipotálamo de mamíferos, no ha sido posible obtener el ADNc que codifica para esta neurohormona en este tejido.

El Factor Liberador de la Hormona del Crecimiento (GRF) es un péptido que está presente en el hipotálamo en muy baja proporción, lo que hizo difícil su identificación. Hasta 1982 fue posible caracterizar un péptido proveniente de un tumor pancreático que poseía actividad liberadora de la Hormona del Crecimiento (62). Posteriormente se aisló de hipotálamo humano un péptido aparentemente idéntico al encontrado en páncreas humano. Por estudios de traducción de ARNm, y por técnicas

de ADN recombinante se encontró que el GRF es sintetizado en páncreas humano vía un precursor de 13,000 daltones, del cual se ha determinado la secuencia total (63).

E. ENFOQUE EXPERIMENTAL.

El estudio de la regulación de la LHRH a nivel de biosíntesis es de gran importancia en el entendimiento de la función de la neurona LHRHérgica en el control neuroendócrino del sistema hipotálamo-hipofisario-gonadal. El conocimiento de los mecanismos que regulan la síntesis, procesamiento y liberación de esta hormona hipotalámica llevaría al mejor entendimiento de los desordenes fisiológicos de este sistema hormonal.

En base a evidencias que postulan la existencia de un precursor biosintético de la LHRH, se planteó la necesidad de -- caracterizar dicho precursor como primer paso en el estudio de la biosíntesis de este neuropéptido. El objetivo de este -- trabajo es caracterizar el precursor de LHRH una vez que ha -- sido sintetizado a partir de ARN mensajero de hipotálamo de -- roedor. La estrategia experimental consiste en aislar ARN men -- sajero de hipotálamo y traducirlo en sistema libre de células. La determinación del peso molecular del precursor de LHRH se realiza mediante la inmunoprecipitación de los productos de -- traducción con anticuerpos anti-LHRH.

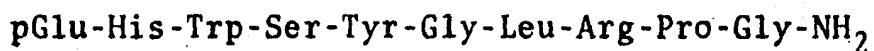
La purificación de ARN requiere de ciertos cuidados para evitar la degradación por ribonucleasas. En la literatura se han reportado una gran variedad de metodologías de obtención de ARN que presentan ciertas ventajas, sin embargo al parecer los dos métodos más apropiados para la obtención de ARN a -- partir de tejidos ricos en lípidos y glicógeno, como el teji -- do cerebral, son el método de Cloruro de Guanidina (64) y el -- método de Tiocianato de Guanidina/Gradiente de Cloruro de Ce -- sio (65). Ambos métodos ofrecen la ventaja de inhibir altamen -- te la acción de ribonucleasas y de dar lugar a preparaciones de ARN libres de protefnas, lípidos y ADN. Para purificar ARN mensajero (ARN-poli(A)) a partir de una preparación de ARN -- total se utilizan principalmente dos métodos cromatográficos de separación: la cromatografía de afinidad en Oligo-dT celulosa

(66) y la cromatografía en Poly-(U)-Sephadex (67). Ambos métodos tienen como principio la hibridación de las cadenas de poliadena 3' en el ARN mensajero con oligonucleótidos sintéticos (dT o U) acoplados a una resina. Mediante la combinación de estas técnicas de purificación, se obtendrán las preparaciones de ARN que serán utilizadas para su traducción en sistema libre de células.

La traducción de ARNm de organismos eucariotes se puede realizar principalmente en dos sistemas libres de células: Lisado de Reticulocito de Conejo (68) y Extracto de Germen de Trigo (69). De estos dos sistemas de traducción, el lisado de reticulocito de conejo es el más usado debido a que presenta una menor variabilidad entre distintas preparaciones, sin embargo ha sido demostrado que ambos sistemas son bastante eficientes para la traducción de ARNm proveniente de distintas fuentes.

Una vez estableciendo las condiciones de traducción en cada sistema, es posible obtener una alta incorporación en proteínas del residuo del aminoácido radioactivo incorporado al sistema. Esto permite el rastreamiento y el estudio de los péptidos generados a partir del ARNm en estudio, sin mayor interferencia del ARN endógeno del sistema de traducción.

El reconocimiento del precursor de LHRH entre los productos de traducción del ARNm de hipotálamo de roedor se realiza mediante ensayos de inmunoprecipitación con varios anticuerpos dirigidos contra la parte central de la molécula de LHRH. Los anticuerpos empleados en este estudio y su sitio antigénico se presentan a continuación:



Millar #1076



Arimura #419



Arimura #743



Arimura #744



Estos sueros fueron generosamente donados por los Drs. Robert Millar (University of Capetown Med. Sch., Capetown, República de Africa del Sur) y A. Arimura (Veterans Administration Hospital, Nueva Orleans, La. E.U.A.), y son los anticuerpos utilizados por los grupos (40) que inicialmente probaron la existencia de una forma precursora de LHRH en extractos de hipotálamo.

El método más adecuado para la purificación de inmunoprecipitados de el resto de los productos de traducción, es la cromatografía en Proteína A de *Staphylococcus aureus* unida a sefarosa (70). Esta proteína tiene la capacidad de unir específicamente las inmunoglobulinas de tipo IgG de ciertas especies. Este método fue probado anteriormente en el laboratorio contra otros métodos de purificación, como la precipitación por segundo anticuerpo, y ha demostrado ser la técnica más conveniente ya que disminuye notablemente el enlace no específico que coprecipita en otros sistemas.

La determinación del peso molecular del péptido inmunoreactivo se realiza mediante electroforesis en gel desnaturante siguiendo la técnica de Laemmli (71) y por autorradiografía de los péptidos radioactivos, con el objeto de facilitar la observación del péptido reconocido específicamente por los anticuerpos anti-LHRH.

II. OBJETIVOS.

La elucidación de los mecanismos de biosíntesis de los factores hipotalámicos de liberación constituye un problema central en neurobiología. La biosíntesis de la LHRH presenta especial interés por ser el péptido involucrado en el control neuroendócrino del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, y por su importancia en la regulación del comportamiento sexual y la reproducción.

Con el objeto de estudiar la biosíntesis de la LHRH y su regulación, se planteó la necesidad de determinar el peso molecular del precursor de LHRH como el paso inicial en el estudio del mecanismo de biosíntesis de este neuropéptido. Evidencias anteriores (59) demuestran que, mediante la traducción de ARN hipotalámico e inmunoprecipitación con anticuerpos anti-Somatostatina de los productos de traducción, fue posible determinar el peso molecular del precursor de Somatostatina. En base a esto, se propuso seguir el mismo enfoque metodológico para la determinación del peso molecular del precursor de LHRH. El objetivo principal de este trabajo es determinar el peso molecular del precursor de LHRH mediante la optimización metodológica de obtención de ARN de hipotálamo de roedor; esto, con el objeto de caracterizar el precursor inmediatamente después de haber sido traducido en sistema libre de células.

El reconocimiento del precursor de LHRH se realiza mediante la inmunoprecipitación de los productos de traducción con varios anticuerpos anti-LHRH dirigidos contra la parte central de la molécula. La determinación del peso molecular se realiza mediante la separación de los productos inmunoprecipitados por cromatografía de afinidad y electroforesis en gel desnaturizante.

A lo largo del trabajo experimental surgió una fuerte evidencia sobre la existencia de un ADNc que daría lugar a un precursor de LHRH en placenta humana de 10,000 daltones de peso molecular. En base a esto, se propuso comprobar si mediante el enfoque experimental usado en este trabajo es posible observar el precursor de 10,000 daltones de placenta humana, y cómo esto se correlaciona con lo observado en hipotálamo de roedor.

III. METODOLOGIA.

A. OBTENCION DE ARN.

En todos los casos en que se involucra la utilización de ARN se obedecen las siguientes precauciones:

- Todo el material a utilizar se libera de ribonucleasas tr tándolo previamente con NaOH 1N y esterilizándolo por autoclave o en horno a 180°C por 12 hrs.
- Todas las soluciones se preparan con agua tratada previame nte con dietilpirocarbonato y se esterilizan por autoclave o a través de filtros Millipore.
- Todas las manipulaciones se realizan a 4°C.

A.1. *Obtención de polisomas de hipotálamo de rata (72).*

Solución amortiguadora de homogenización.

Cloruro de potasio 100mM.

Acetato de magnesio 5mM.

Tris-HCl pH 7.0 30mM.

Cloruro de calcio 3mM.

Heparina 1 µg/µl.

a) Disecar el tejido.

b) Resuspender en solución de homogenización (10 ml/gr de

- tejido).
- c) Homogenizar el tejido utilizando vástago de teflón (homogenizador Bellco Glass Inc.).
 - d) Añadir Tritón a una concentración final de 0.5 a 1.0%.
 - e) Volver a homogenizar.
 - f) Centrifugar a 10,000g y 20,000g por 10 minutos a 4°C.
 - g) Recuperar el sobrenadante y centrifugar a 100,000g por dos horas en ultracentrífuga.
 - h) Eliminar el sobrenadante.
 - i) Lavar ligeramente la pastilla de polisomas.
 - j) Almacenar los polisomas a -70°C hasta el momento de traducir o extraer el ARN.

A.2. Extracción de ARN.

A.2.1. METODO DE GUANIDINA-HCl (64).

- a) Homogenizar el tejido en solución amortiguadora A (20 ml/g) (Solución amortiguadora A: guanidina-HCl 7M, acetato de sodio 20mM, ditiotreitól (DTT) 1mM, pH 5.0). Utilizar homogenizador Polytron a máxima velocidad.
- b) Transferir el homogenado a botellas de centrífuga y centrifugar a 11,000g por 30 minutos a -10°C.
- c) Filtrar el sobrenadante sin revolver el precipitado a través de una gasa estéril para eliminar lípidos.
- d) Agregar 0.55 volúmenes de etanol a -20°C. Precipitar el ARN a -20°C de 12 a 24 horas.
- e) Sedimentar el ARN por centrifugación a 11,000g por 30 minutos a -10°C.
- f) Decantar el sobrenadante y disolver la pastilla en un mínimo de volumen de solución amortiguadora B (Solución amortiguadora B: guanidina-HCl 7M, acetato de sodio 20mM, ditiotreitól (DTT) 1mM, EDTA 20mM, pH 7.0).
- g) Homogenizar manualmente en homogenizador tipo "Dounce". - Tomar alícuota (5-10µl). Determinar densidad óptica a 230, 260, y 280 nm.

- h) Agregar 0.55 volúmenes de etanol a -20°C . Precipitar a -20°C de 12 a 24 horas.
- i) Repetir los pasos c, f, g, y h dos veces.
- j) Disolver el ARN en un volumen mínimo de EDTA 20mM pH 7.0. Tomar alícuota, determinar densidad óptica.
- k) Extraer con un volumen igual de una mezcla de cloroformo-butanol 4:1 (v/v). Centrifugar a 11,000g, 4°C por 5 minutos para separar ambas fases.
- l) Remover y guardar la fase superior acuosa (sin llevar la capa de proteínas).
- m) Reextraer la capa orgánica con un volumen igual de EDTA 20mM pH 7.0. Separar ambas fases por centrifugación.
- n) Unir las dos fases acuosas.
- ñ) Tomar alícuota de la fase acuosa (5-10 μl). Determinar densidad óptica a 230, 260 y 280 nm.
- o) Agregar 1/10 volumen de acetato de potasio 20% pH 6.0 y 2 volúmenes de etanol a -20°C y precipitar el ARN por 12-24 horas.
- p) Sedimentar el ARN por centrifugación.
- q) Resuspender el ARN en un mínimo de agua bidestilada estéril. Tomar alícuota, determinar densidad óptica a 230, 260 y 280nm.
- r) Repetir los pasos o y p.
- s) Eliminar totalmente el etanol restante (secando al vacío o con nitrógeno gaseoso).
- t) Resuspender la pastilla final de ARN en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril para tener una concentración final de 1.5 mg/ml.

A.2.2. METODO DE TIOCIANATO DE GUANIDINA-GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO (65).

Solución de homogenización

Tiocianato de Guanidina 4.2M

Lauril sarcosianato de sodio (Sarkosil) 17mM.

Citrato de sodio 25mM pH 7.0.

β -Mercaptoetanol 0.7%.

Antiespumante "A" 0.1%

- a) Homogenizar el tejido en solución de homogenización (16 ml/g de tejido) a máxima velocidad con el homogenizador Polytron por 30-60 segundos (realizar estas manipulaciones en campana de aire).
- b) Transferir el homogenado a un tubo de ultracentrifuga (polialómero) que contenga un cuarto de volumen de solución de cloruro de cesio (cloruro de cesio 5.66M en EDTA 60mM pH 7.0) para rotores de columpio o con un tercio de dicha solución para rotores de ángulo fijo. Llenar los tubos hasta el tope.
- c) Centrifugar a 36,000rpm a 20°C por 12 horas para rotores chicos y 18 horas para rotores grandes.
- d) Lavado del gradiente: Eliminar la solución de cloruro de cesio con cuidado de no llevarse la pastilla de ARN (fondo del tubo) y lavar las paredes del tubo con agua bidestilada estéril.
- e) Lavar la pastilla de ARN con etanol al 70% a -20°C (aproximadamente 0.5 ml) sin disolver la pastilla. Eliminar el máximo de etanol.
- f) Resuspender el ARN en un mínimo volumen de EDTA 2mM pH 7.4, calentar a 60°C por 10 minutos, transferir a un tubo estéril.
- g) Tomar alícuota (5-10µl). Determinar densidad óptica a 230, 260 y 280 nm.
- h) Agregar 1/10 volúmenes de acetato de potasio 20% pH 6.0 y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C. Precipitar a -20°C por 12-24 horas o a -70°C por 15 minutos.
- i) Sedimentar el ARN por centrifugación a 11,000g por 30 minutos a -10°C.
- j) Repetir los pasos f,g,h,i.
- k) Resuspender la pastilla final de ARN en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril para tener una concentración final de 1.5 mg/ml.

A.3. *Purificación de la fracción poli-(A) del ARN (Purificación del ARN mensajero).*

A.3.1. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN OLIGO-dT CELULOSA (66).

- a) Preparar una columna con la cantidad suficiente de la resina para exceder 10 veces la cantidad de ARN-poli(A) a purificar.
- b) Lavar la columna con un volumen de NaOH 0.1M para liberar de ribonucleasas.
- c) Lavar la columna varias veces con solución alta en sal hasta que el pH del afluente sea pH 7.5 (Solución alta en sal: Tris-HCl 10mM, pH 7.5, cloruro de sodio 0.5M, EDTA 1mM).
- d) Disolver el ARN en EDTA 2mM pH 7.5 (2mg/ml). Calentar a 65°C por 10 minutos. Enfriar a 4°C.
- e) Diluir la muestra 1:1 con solución alta en sal 2X.
- f) Aplicar la muestra en la columna (flujo de la columna: 0,5 ml/min).
- g) Lavar la columna varias veces con solución alta en sal. Determinar densidad óptica a 230, 260 y 280 nm de los lavados. Lavar hasta que la densidad óptica regrese a cero (basal).
- h) Lavar con dos volúmenes más de solución alta en sal.
- i) Eluir el ARN-poli(A) con solución baja en sal (Solución baja en sal: Tris-HCl 10mM pH 7.5). Recolectar el afluente en fracciones y determinar densidad óptica a 260 nm.
- j) Eluir hasta que la densidad óptica regrese a cero (basal). Colectar las fracciones de mayor densidad óptica. Tomar una alícuota del total y determinar densidad óptica a 230, 260 y 280 nm. Determinar la concentración de ARN-poli(A).
- k) Agregar 1/10 de volumen de acetato de potasio al 20% pH 6.0 y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C. Precipitar a -20°C por 24 horas.
- l) Sedimentar el ARNm por centrifugación a 11,000g por 30 minutos a -10°C.
- m) Eliminar el etanol restante (con nitrógeno gaseoso o secando al vacfo).
- n) Resuspender el ARNm en un volumen adecuado de agua bidesti

lada estéril para tener una concentración final de 0.5mg/ml.

A.3.2. CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD EN POLY(U)-SEPHADEX (67).

- a) Preparar una columna con la cantidad suficiente de resina para exceder 10 veces la cantidad de ARN-poli(A) a purificar.
- b) Lavar la columna varias veces con solución de unión (Solución de unión: cloruro de sodio 0.2M, Tris-HCl 10mM pH 7.5 EDTA 1.0mM, SDS 0.2%).
- c) Resuspender el ARN en solución de unión para tener una concentración final de 1mg/ml.
- d) Calentar a 65°C por 5 minutos y enfriar a 4°C.
- e) Aplicar la muestra a la columna.
- f) Lavar la columna con 10 volúmenes de solución de unión.
- g) Eluir el ARN-poli(A) con solución de elución (de 11 a 12 ml) (Solución de elución: formamida 90%, Tris-HCl 10mM pH 7.5, EDTA 1.0mM, SDS 0.2%).
- h) Colectar el afluyente de ARN-poli(A) y agregar 1/10 de volumen de acetato de potasio al 20% pH 6.0 y 2.5 volúmenes de etanol a -20°C. Precipitar a -20°C de 12 a 24 horas.
- i) Sedimentar el ARNm centrifugando a 11,000g por 30 minutos a -10°C.
- j) Resuspender la pastilla de ARNm en un mínimo de volumen de agua bidestilada estéril. Tomar alícuota (5-10µl). Determinar densidad óptica a 230, 260 y 280 nm.
- k) Repetir los pasos h,i.
- l) Eliminar el etanol restante de la pastilla de ARN.
- m) Resuspender en un volumen adecuado de agua bidestilada estéril para tener una concentración final de 0.5mg/ml.

B. SISTEMAS DE TRADUCCION.

B.1. Sistema libre de células de reticulocito de conejo (68).

B.1.1. PREPARACION DEL LISADO DE RETICULOCITO DE CONEJO.

Esta técnica se realiza en el laboratorio del Dr. L. Díaz de León, del Depto. de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Con el fin de obtener una población elevada y uniforme de reticulocitos (85%), se induce anemia en conejos de Nueva Zelanda (2-2.5Kg) inyectando repetidamente fenilhidrazina. La fenilhidrazina se administra subcutáneamente en una concentración al 2.5% en carbonato de sodio, en la siguiente dosis: 0.25 ml de la solución de fenilhidrazina diariamente por seis días, alternando el sitio de inoculación. Paralelamente se inyecta intramuscularmente con 1ml de una solución que contenga 10mg de vitamina B-12 y 1mg de ácido fólico en solución salina isotónica.

Cuando se obtienen valores de 85% de reticulocitos se sacrifican los conejos sangrandose a blanco por punción cardíaca. Paralelamente se colecta la sangre de 2-3 conejos, utilizando heparina como anticoagulante (500-1000 unidades/ml de sangre) se filtra a través de una gasa estéril y se centrifuga a 1000g por 5 minutos a 20°C para separar el paquete celular del suero. El paquete celular se resuspende en 5-10 volúmenes de solución de lavado (cloruro de sodio 0.14M, cloruro de magnesio 5mM, cloruro de potasio 50mM) y se centrifuga bajo las mismas condiciones. La solución de lavado, así como las células blancas y las plaquetas se eliminan por aspiración con vacío. El procedimiento de lavado se repite dos veces más, y el paquete final de reticulocitos se lisa añadiendo un volumen de solución de lisis (cloruro de magnesio 2mM, EDTA 0.1mM pH 7.0, ditiotreitól 1.0mM) e incubando a 4°C por 10 minutos. El lisado se separa de los componentes membranales por centrifugación a 11,000g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se divide en alícuotas de 1-2ml y se almacena a -70°C.

B.1.2. TRATAMIENTO DEL LISADO CON NUCLEASA MICROCOCAL.

Con el fin de eliminar el ARN endógeno del lisado de reticulocito de conejo, se trata el lisado con nucleasa micrococcal bajo las siguientes condiciones:

Por cada mililitro de lisado se agregan 25 μ l de solución de leucina 8.8mM y 10 μ l de solución de creatin-cinasa (5mg/ml), 20 μ l de cloruro de calcio 50mM y 30 μ l de solución de nucleasa micrococcal.

Se incuba por 10 minutos a 20°C y se termina la reacción por adición de 20 μ l/ml de una solución de EGTA 100mM.

El lisado tratado se divide en alícuotas de 50 y 100 μ l y se congela a -70°C hasta el momento de la traducción.

B.1.3. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD DE TRADUCCION DEL ARN MENSAJERO.

Por cada ARN a traducir se realiza una curva dosis respuesta.

La concentración de ARN a titular es:

ARN total: 1.5mg/ml
ARN poli(A) 0.5mg/ml

Traducción tipo:

Mezcla de incubación

| <u>Reactivo</u> | <u>Vol/15μl tubo</u> |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Cloruro de potasio | 0.30 μ l |
| Acetato de potasio 2M pH7.2 | 0.75 μ l |
| Fosfato de creatina 0.2M | 0.75 μ l |
| Mezcla de aminoácidos 1mM (sin metionina) | 0.75 μ l |
| HEPES 0.5M pH7.2 | 0.75 μ l |
| (³⁵ S)-Metionina (1050 Ci/mM; 15 Ci/tubo) | 1.50 μ l |
| Agua destilada | 0.20 μ l |
| | <u>5.00μl</u> |

| <u>Tubo</u> | <u>Mezcla de Incubación</u> | <u>ARN</u> | <u>H₂O</u> | <u>Lisado</u> | <u>Volumen Total</u> |
|-------------------------|-----------------------------|------------|-----------------------|---------------|----------------------|
| No ARN | 5µl | - | 5µl | 5µl | 15µl |
| Curva dosis respuesta 1 | 5µl | 1µl | 4µl | 5µl | 15µl |
| 2 | 5µl | 2µl | 3µl | 5µl | 15µl |
| 3 | 5µl | 3µl | 2µl | 5µl | 15µl |
| 4 | 5µl | 4µl | 1µl | 5µl | 15µl |
| 5 | 5µl | 5µl | - | 5µl | 15µl |
| ARN control 1 | 5µl | 2µl | 3µl | 5µl | 15µl |
| 2 | 5µl | 4µl | 1µl | 5µl | 15µl |

Incubar a 30°C por 60 minutos. Agregar 2.5µl de solución de ribonucleasa pancreática (1mg/ml) a cada tubo.

Incubar a 30°C por 30 minutos.

De la mezcla de reacción se toman alícuotas de 5µl para la determinación de radioactividad incorporada y 12.5µl para el análisis de patrones de traducción por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

B.1.4. DETERMINACION DE INCORPORACION DE MARCA.

Para determinar la incorporación de aminoácidos en las protefmas codificadas por el ARNm, se cuantifica la incorporación de radioactividad en las protefmas precipitables con ácido tricloroacético (TCA) con el siguiente método:

Tomar 5µl de cada ensayo y diluir en 1ml de agua bidestilada.

Agregar 5ml de solución decolorante (H₂O₂ + NaOH)

Agregar 1ml de ácido tricloroacético 25% y agitar.

Filtrar las protefmas precipitables a través de filtros millipore tipo HA45 previamente embebidos en ácido tricloroacético al 8% + metionina (1mg/ml).

Secar los filtros a 100°C por 15 minutos y transferir a viales que contengan líquido de centelleo.

Determinar radioactividad incorporada por ensayo (contador de centelleo líquido), expresada como cuentas por minuto.

Una vez que se determina la concentración de ARNm en

cuestión en la que se obtiene la máxima actividad de traducción, se traduce el ARN en mayor proporción para la inmunoprecipitación de los productos generados.

B.2. Extracto de Germen de Trigo (69).

El extracto de germen de trigo se utiliza ampliamente para traducir *in vitro* una gran variedad de ARN mensajeros a proteína, ya que se conserva íntegramente el aparato de traducción de estas células.

B.2.1. ENRIQUECIMIENTO DEL GERMEN DE TRIGO.

Enriquecer los embriones intactos y viables por flotación en ciclohexano/tetracloruro de carbono (1:2.5).

Dejar sedimentar los contaminantes y embriones dañados por 2-3 minutos. Colectar los embriones viables por filtración en Buchner (campana de aire) y dejarlos secar al aire.

B.2.2. PREPARACION DEL EXTRACTO DE GERMEN DE TRIGO.

Para la preparación del extracto de germen de trigo se siguen tres pasos principales, que son la homogenización del germen viable, la centrifugación del homogenado y la filtración en gel del sobrenadante.

Todas las manipulaciones se realizan a 4°C en el menor tiempo posible y con soluciones esterilizadas y filtradas, y con material horneado a 180°C.

-Solución de Homogenización: Acetato de potasio 100mM, acetato de magnesio 1mM, cloruro de calcio 2mM, HEPES 40mM pH 7.5, ditiotreitól (DTT) 4mM.

-Solución de columna: Acetato de potasio 100mM, acetato de magnesio 5mM, HEPES 40mM pH 7.5, DTT 4mM.

Procedimiento:

a) Homogenizar el germen de trigo viable en un mortero que contenga nitrógeno líquido. Homogenizar por 1-2 minutos

hasta obtener un polvo fino.

- b) Transferir a un mortero limpio en baño de hielo y homogeneizar en solución hasta obtener una pasta espesa.
- c) Transferir a un tubo de centrifuga previamente enfriado y centrifugar a 23,000g por 10 minutos a 4°C.
- d) Transferir el sobrenadante a un tubo limpio (sin que se lleve la capa lipídica que se forma) y centrifugar en las mismas condiciones.
- e) Separar el sobrenadante. Medir volúmenes.

Filtración en gel.

La filtración en gel del extracto de germen de trigo se realiza para reducir la concentración de aminoácidos libres que puedan competir en la incorporación a proteína con los aminoácidos radioactivos durante la traducción *in vitro* del ARNm.

- a) Preparar una columna de vidrio con resina Sephadex G-25. Equilibrar la columna con solución de columna estéril.
- b) Aplicar el sobrenadante del extracto de germen de trigo sobre la columna y eluir con solución de columna.
- c) Colectar la solución opaca que eluye inmediatamente después del volumen muerto. (Colectar en varias fracciones).
- d) Descartar el pigmento amarillo que eluye más lentamente.
- e) Colectar las fracciones más opacas en un tubo estéril de centrifuga y centrifugar a 23,000g por 10 minutos a 4°C.
- f) Repartir el sobrenadante en alícuotas de 100-200µl y congelar inmediatamente a -70°C en nitrógeno líquido.

B.2.3. TRATAMIENTO DEL EXTRACTO DE GERMEN DE TRIGO CON NUCLEASA MICROCOCAL.

El tratamiento con nucleasa micrococal se realiza para eliminar el ARN endógeno del sistema, que es capaz de competir por los ribosomas y los factores necesarios para la traducción con el ARN exógeno adicionado al sistema.

- a) Disolver la nucleasa micrococal de *Staphylococcus aureus*

en agua bidestilada para tener una concentración final de 1875 unidades/ml. Congelar en alícuotas a -70°C .

- b) Agregar $2\mu\text{l}$ de la nucleasa diluida preparada a $100\mu\text{l}$ de extracto de germen de trigo. Adicionar $2\mu\text{l}$ de cloruro de calcio 0.1M e incubar por 5 minutos a 21°C mezclandolo ocasionalmente.
- c) Terminar la reacción transfiriendo a un baño de hielo y agregando $4\mu\text{l}$ de EGTA 0.1M .
- d) Almacenar el extracto digerido en alícuotas a -70°C en nitrógeno líquido.

B.2.4. COMPONENTES DEL ENSAYO DE TRADUCCION.

Cuando se realiza un ensayo de traducción en extracto de germen de trigo, es necesario adicionar ciertos factores que son requeridos para una eficiente traducción. Entre estos factores están; un sistema de energía, aminoácidos y los iones K^{+} y Mg^{2+} en concentración adecuada (titulada para el ARN de interés). Estos factores se preparan como soluciones concentradas y de estas se prepara una mezcla que es adicionada al extracto de germen de trigo en el momento de la traducción.

Soluciones Requeridas:

| | <u>Concentración en la mezcla</u> | <u>Concentración en el sistema de traducción.</u> |
|---------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Cloruro de Potasio 2.0M | 280mM | 80mM |
| Acetato de Magnesio 100mM | 4mM | 1.8mM |
| HEPES 1.0M | 70mM | 18mM |
| Ditiotreitol (DTT) 45mM | 9mM | 2mM |
| ATP 25mM | 5mM | 1mM |
| GTP 1mM | 0.1mM | 0.02mM |
| Spermidina 2.5M | 0.25mM | 0.05mM |

Los siguientes reactivos se adicionan por separado a la mezcla de traducción :

| | | |
|---------------------------------------------------|-----|---------------|
| Mezcla de aminoácidos 2mM c/u. (sin metionina) | 1mM | 20 μ M |
| Fosfato de Creatina (C.P.) 0.6M | | 9.6mM |
| Creatin-fosfocinasa 8mg/ml | | 64 μ g/ml |
| (³⁵ S)-Metionina (500 Ci/ml) | | 25 μ Ci |

Todas las soluciones se preparan por separado y se almacenan en alícuotas pequeñas a -20°C. La creatin-fosfocinasa se adiciona hasta el momento de la traducción.

Es conveniente tener el ARN para traducir a una concentración de 1mg/ml (en agua bidestilada estéril). La concentración final óptima de ARN en la reacción de traducción debe ser determinada para cada preparación de ARN a traducir. Usualmente la concentración de ARN es de 1-3 μ g por ensayo.

Ensayo:

Los componentes del ensayo de traducción se combinan en un tubo a 4°C en el siguiente orden:

Agua (para completar el volumen de reacción a 50 μ l), mezcla de aminoácidos (más la metionina radioactiva) mezcla de energía (ATP, GTP, K⁺, Mg²⁺), fosfato de creatina, creatin-fosfocinasa, ARN a traducir, extracto de germen de trigo.

La mezcla de traducción se incuba a 25°C por 90 minutos. Para terminar la reacción se transfiere el tubo de reacción a un baño de hielo.

B.2.5. INCORPORACION DE MARCA A PROTEINA TOTAL.

Este ensayo se realiza para conocer la eficiencia de traducción del ARN en base a la cantidad de proteínas precipitables, y depende del aminoácido radioactivo empleado, para el caso de metionina:

- a) Colocar una alícuota (2-5 μ l) de cada mezcla de traducción en un disco de papel filtro Whatman 3M (2.5 cm de diámetro).

Insertar en el filtro un alfiler para su fácil manipulación y marcar el filtro con un lápiz.

- b) Incubar los filtros en un baño de ácido tricloroacético (TCA) al 10% por 30 minutos en baño de hielo.
- c) Decantar el TCA al 10% y añadir TCA al 5%. Calentar a ebullición en campana de aire por 15 minutos.
- d) Decantar el TCA 5% caliente y enjuagar los filtros 3 veces con TCA 5% fresco.
- e) Transferir los filtros a una solución de etanol-éter 1:1 por 5 minutos.
- f) Decantar la solución etanol-éter y adicionar éter. Incubar por 5 minutos.
- g) Decantar el éter y secar los filtros en campana de aire.
- h) Contar los filtros en líquido de centelleo que contenga tolueno.

C. ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.

Gel de Poliacrilamida-SDS-Urea. - Gel en dos dimensiones (71).

Para la separación de péptidos en base a su peso molecular, se realiza la electroforesis en gel desnaturizante de poli--acrilamida-SDS en dos dimensiones.

C.1. Preparación del Gel de Poliacrilamida.

a) Gel separador (inferior):

| | <u>10%</u> | <u>12%</u> | <u>15%</u> |
|------------------------------------|------------|------------|------------|
| Acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8% | 10ml | 12ml | 15ml |
| Tris-HCl 1.5M pH8.8 | 7.5ml | 7.5ml | 7.5ml |
| Agua bidestilada | 9.7ml | 7.7ml | 4.7ml |
| Urea 8M | 1.9ml | 1.9ml | 1.9ml |
| SDS 5% | 1.2ml | 1.2ml | 1.2ml |
| Desgasificar con vacío | | | |
| Persulfato de amonio | 0.2ml | 0.2ml | 0.2ml |
| TEMED | 0.02ml | 0.02ml | 0.02ml |

b) Gel concentrador (superior)

| | <u>4.5%</u> | <u>6.25%</u> |
|------------------------------------|-------------|--------------|
| Acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8% | 4.5ml | 6.25ml |
| Tris-HCl 0.5M pH6.8 | 7.5ml | 7.5ml |
| Agua bidestilada | 15.4ml | 13.15ml |
| Urea 8M | 1.9ml | 1.9ml |
| SDS 5% | 0.6ml | 0.6ml |
| Desgasificar con vacío | | |
| Persulfato de amonio | 100 μ l | 100 μ l |
| TEMED | 15 μ l | 15 μ l |

Solución de corrida:

Glicina 0.2M, Tris-base 0.025M, SDS 1%, Urea 0.5M.

Solución de muestra:

Tris-HCl 0.05M pH 6.8, SDS 1%, glicerol 10%, urea 0.5M, azul de bromofenol.

- c) Antes de aplicar al gel, diluir la muestra en solución de muestra y agregar 1/4 de volumen de una solución de ditiotreitol (DTT) 0.5M.
- d) Hervir la muestra por 5 minutos.
- e) Enfriar a temperatura ambiente.
- f) Aplicar al gel.

Los geles se preparan en cámaras de electroforesis verticales, de 0.75mm de grosor y se corren a amperaje constante, de 15mAmp para el gel concentrador y 30mAmp para el gel separador.

Una vez finalizada la electroforesis, los geles son tratados con dimetilsulfóxido (DMSO)/difeniloxasol (PPO) 20%, para fluorografía.

C.2. Tratamiento del gel para Fluorografía. (73).

- Después de la electroforesis fijar el gel en ácido tricloroacético 50% por dos horas o toda la noche.
 - Decantar la solución fijadora.
 - Desechar el gel en dimetilsulfóxido (DMSO) incubando de 15 a 30 minutos con agitación en campana de aire.
 - Eliminar el DMSO usado. Repetir dos veces el tratamiento con DMSO.
 - Tratar con una solución de DMSO/PPO 20% por una hora con agitación en campana de aire.
 - Eliminar la solución de DMSO/PPO 20%.
 - Lavar el gel varias veces con agua bidestilada.
 - Montar el gel en una hoja de papel filtro Whatman #1 y - cubrirlo con plástico suave.
 - Deshidratar el gel al vacío y con calentamiento (secador de geles en placa Bio-Rad) por 30-40min.
- Exponer el gel con película para rayos X Kodak XRP-5 y con pantalla intensificadora a -70°C por periodos de tiempo variables.
- Revelar y fijar las placas de acuerdo a los métodos convencionales de fotografía.

D. INMUNOPRECIPITACION DE PRODUCTOS DE TRADUCCION.

Siliconizar previamente todo el material a utilizar.

- a) Resuspender los productos de traducción del ARN-poli(A) - del tejido en cuestión en solución de inmunoprecipitación (Solución de inmunoprecipitación: fosfato de sodio 0.05M pH 8.0, cloruro de sodio 0.15M, azida de sodio 0.002%, tritón X-100 0.5%, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.002M, albúmina sérica bovina (grado RIA) 1mg/ml), inmediatamente después de ser traducidos.
- b) Eliminar los polisomas restantes del sistema de traducción por centrifugación a 11,000 g por 20 minutos.
- c) Inmunoprecipitar los productos de traducción, ya sea con sueros anti-LHRH o con suero normal de conejo.
- d) En los casos de desplazamiento por el péptido sintético, agregar 10µg de LHRH por mililitro de sistema de inmunoprecipitación.
- e) Incubar el sistema de inmunoprecipitación por 24 horas a 4°C.
- f) Separar el complejo antígeno-anticuerpo formado por cromatografía de afinidad a proteína A-Sefarosa (proteína A de *Staphylococcus aureus*, capaz de unir inmunoglobulinas).
- g) Eluir este complejo en ácido acético 0.1M, una vez que se han eliminado perfectamente los contaminantes después de varios lavados con solución amortiguadora de fosfatos - (fosfato de sodio 0.05M pH 8.0, cloruro de sodio 0.15M).
- h) Evaporar el ácido acético a sequedad (evaporador con vacío tipo "Savant"), y someter los péptidos selectivamente reconocidos por el anticuerpo a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS, para la determinación del peso molecular de los péptidos inmunoreactivos.

IV. RESULTADOS.

A. OPTIMIZACION METODOLOGICA.

A.1. Obtención de ARNm.- Rendimiento y Titulación.

Con el objeto de optimizar la metodología de purificación de ARN-poli(A) de hipotálamo de roedor se realizaron varias preparaciones de ARN a lo largo del período de trabajo experimental. Cada una de las preparaciones de ARN fue titulada en base a su calidad de traducción en lisado de reticulocito de conejo, realizando una curva dosis respuesta de acuerdo a lo descrito en la sección de métodos. La tabla # 1 muestra el rendimiento y la actividad de traducción de las preparaciones. Mediante la purificación de ARN por homogenización en Cloruro de Guanidina y cromatografía en oligo-dT celulosa se obtienen las preparaciones con mayor actividad en la traducción. En términos de rendimiento de ARN, parece ser mejor el método de purificación con Tio-cianato de Guanidina y cromatografía en poly(U)-Sephadex, sin embargo la actividad de traducción de esta preparación no es comparable con la obtenida al utilizar el método anterior. Estos resultados demuestran que a pesar de enriquecer el ARNm a partir de la fracción polisomal, la actividad de traducción no aumenta en comparación con preparacioo...

nes de ARN en las que se parte de tejido total para la purificación de ARNm por los métodos convencionales. Al purificar dos veces sucesivas el ARN-poli(A) por cromatografía en oligo-dT celulosa se observa un aumento en la actividad de traducción del ARN por enriquecimiento de la fracción poli(A) con respecto al ARN total. Este procedimiento no se siguió en todos los casos debido al bajo rendimiento del método. Se puede observar que el ARN de hipotálamo con mayor actividad en la traducción es el ARN proveniente de hipotálamo de rata (preparación 5), que presenta una incorporación de radioactividad en proteína precipitable por TCA, siete veces mayor que la incorporación que se presenta al no adicionar ARN exógeno al sistema de traducción (actividad basal) (figura # 1). Esta preparación de ARN-poli(A)⁺⁺ fue utilizada en algunos de los experimentos de inmunoprecipitación de productos de traducción. Se obtuvo además una preparación de ARN-poli(A)⁺ de cerebro total de rata con mayor actividad de traducción en comparación con el resto de las preparaciones de ARN. Esta diferencia puede ser explicada en base, bien a la degeneración del tejido en el momento de realizar la disección, la cual es menor al manipular cerebro total; o bien, a que se procesa una mayor cantidad de tejido en masa y esto mejora el rendimiento total, además de evitar la degradación.

A.2. Lisado de Reticulocito de Conejo y Extracto de Germen de Trigo como Sistemas de Traducción.

Ciertas preparaciones de ARN fueron probadas por su actividad de traducción empleando dos sistemas libres de células: Lisado de reticulocito de conejo y extracto de germen de trigo. Los resultados de estas titulaciones se muestran en la tabla # 2 y en la figura # 2 (a,b). La actividad neta de incorporación de radioactividad en proteínas precipitables por TCA es mayor cuando se traduce el ARN de hipotálamo de ratón en extracto de germen de trigo, que cuando la traducción se realiza en lisado de reticulocito de conejo.

Sin embargo, esto no ocurre con el ARN viral (control) o con el ARN de placenta humana. Esta diferencia se explica en base a los requisitos de cada ARN exógeno al sistema de traducción. Además, es necesario traducir cada ARN en ambos sistemas, para comprobar la eficiencia de traducción no sólo en base a la radioactividad en proteína precipitable por TCA, sino también en base a la variedad de productos de traducción de alto peso molecular, observados mediante el análisis de los patrones de traducción por electroforesis en geles de poliacrilamida.

2.1. ANALISIS ELECTROFORETICO DE LOS PRODUCTOS DE TRADUCCION.

Después de traducir cada preparación de ARN se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS para observar la integridad de los productos de traducción así como el patrón proteico específico para cada tejido.

La figura # 3 muestra el patrón electroforético de los productos de traducción obtenidos al realizar una curva dosis respuesta en lisado de reticulocito de conejo con el ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2). Como puede observarse hay una gran variedad de polipéptidos sintetizados en el hipotálamo de peso molecular variable, lo que demuestra la integridad del ARN. En este tejido no se observan bandas más prominentes que demuestren un enriquecimiento en una proteína en particular. Al analizar el patrón electroforético de los productos de traducción del ARN de hipotálamo de ratón preparado por el método de tiocianato de Guanidina (preparación 3), no se observan bandas de alto peso molecular a pesar de obtener una alta incorporación de radioactividad precipitable (figura 4c). Posiblemente esto se deba a una inhibición temprana en la síntesis de péptidos por algún factor que copurifique con el ARN durante su extracción (65). Esto mismo se observa cuando se traduce esta preparación de ARN en extracto de germen de trigo (figura 5b).

Al traducir ARN total o ARN-poli(A) de placenta humana se observa que el patrón peptídico es altamente enriquecido cuando la traducción se realiza con el ARN-poli(A) (figura

4 d,e). Por otro lado el ARN de placenta humana traducido tanto en lisado de reticulocito de conejo como en extracto de germen de trigo, muestra una banda mayoritaria que corresponde a 28,000 daltones de peso molecular.

2.2. REQUISITOS DEL SISTEMA DE TRADUCCION.

Tal y como se ha reportado (74), se observó que las condiciones óptimas de traducción son variables para cada preparación de ARN, lo que hace necesario establecer por separado las concentraciones de ciertos iones en cada sistema de traducción para ARN provenientes de distintas fuentes. Se ha reportado (74) que uno de los factores más críticos que varía para cada tipo de ARN es la concentración de magnesio. En lisado de reticulocito de conejo se titularon las preparaciones de ARN de hipotálamo de ratón y de placenta humana a concentración variable de este ión (figura # 6). Al aumentar la concentración de Mg⁺⁺ a un valor de 1.5mM, se obtiene un incremento de dos veces en la actividad de traducción del ARN de hipotálamo de ratón, y de una vez para el ARN de placenta humana al aumentar la concentración de este ión a 1.0mM.

El extracto de germen de trigo había sido previamente optimizado por la Dra. M. Morrison (75).

A.3. Inmunoprecipitación.

En un trabajo previo (70) se demostró que el mejor sistema de inmunoprecipitación es la cromatografía de afinidad utilizando proteína A-Sefarosa (proteína A de *Staphylococcus aureus*) que une específicamente inmunoglobulinas de tipo IgG 1, 2,3. Como primera etapa, fue necesario probar la habilidad de cada suero de reconocer (¹²⁵I)-LHRH y de acoplarse específicamente a la proteína A. Los anticuerpos anti-LHRH utilizados son: Millar 31076, Arimura #419, Arimura #743 y Arimura #744. En cada ensayo se incubó en solución de inmunoprecipitación el suero anti-LHRH con (¹²⁵I)-LHRH (preparado en el laboratorio de acuerdo a Nett (76)). Como control de pegado

inespecífico se incubó suero normal de conejo con (^{125}I)-LHRH bajo las mismas condiciones. Los inmunoprecipitados fueron separados en columnas de proteína A-Sefarosa realizando varios lavados con solución amortiguadora de fosfatos y eluyendo el inmunoprecipitado en dos fracciones con ácido acético 0.1M como es descrito en la sección de métodos. Todas las fracciones correspondientes a los lavados, así como los eluados de ácido acético fueron recolectadas por separado para la determinación de radioactividad eluida en cada fracción, expresada como cuentas por minuto. De estos resultados (figura # 7) se observa que el suero Arimura # 744 se une con menor afinidad a proteína A-Sefarosa. Esto puede deberse a que este suero contenga una baja proporción de inmunoglobulinas anti-LHRH de tipo IgG 1,2 o 3. El suero anti-LHRH Arimura # 419 posee un título menor que el resto de los sueros anti-LHRH utilizados lo que concuerda con observaciones anteriores (77).

B. CARACTERIZACION DEL PESO MOLECULAR DEL PRECURSOR DE LHRH.

B.1. Reconocimiento de una Señal Inmunoprecipitable.

Se probó la habilidad de varios anticuerpos anti-LHRH de reconocer una señal dentro de los productos de traducción del ARN de hipotálamo, la cual pudiera ser desplazable por el antígeno sintético y que a su vez no fuera reconocida por el suero normal de conejo. Con este fin se tradujeron 32 μg de ARN de hipotálamo de rata (preparación 5) en lisado de reticulocito de conejo y sus productos de traducción fueron divididos en 10 fracciones iguales. Cada fracción se incubó en solución de inmunoprecipitación con cada uno de los sueros antes descritos o con suero normal de conejo a una dilución final de 1:2000. En los casos de desplazamiento se agregó LHRH sintética a la fracción correspondiente. Los inmunoprecipitados fueron separados en columnas de proteína A-Sefarosa, y los eluados de ácido acético fueron recolectados en frascos que contenían líquido de centelleo para la determinación de radioactividad precipitable en cada sistema. La tabla

3 muestra que el suero anti-LHRH Millar # 1076 es capaz de precipitar mayor radioactividad incorporada que el suero normal de conejo, que además es desplazable por la LHRH. Los sueros Arimura # 744 , #743 y #419 no muestran un desplazamiento significativo con la LHRH sintética, como tampoco una diferencia en radioactividad precipitable con suero normal de conejo; sólo el suero anti-LHRH Millar # 1076 presenta una diferencia significativa de la señal sobre el ruido de fondo. Esto sugiere que hay un mayor reconocimiento del suero # 1076 por el sitio antigénico dentro de una secuencia peptídica mayor, lo que concuerda con reportes anteriores (40); dicho anticuerpo reconoce un péptido de más de 5,000 daltones de peso molecular dentro de ciertas fracciones cromatográficas de extractos de hipotálamo. En base a estas observaciones se utilizó el suero anti-LHRH # 1076 para experimentos posteriores de inmunoprecipitación de los productos de traducción y determinación del peso molecular del precursor de LHRH.

B.2. Determinación del Peso Molecular del Precursor de LHRH.

Con el objeto de determinar el peso molecular del precursor de LHRH, se realizaron varios ensayos de traducción de ARN de hipotálamo e inmunoprecipitación de los productos con el anticuerpo anti-LHRH # 1076 y electroforesis en gel desnaturante de poliacrilamida-SDS. De esta forma fue posible observar un péptido inmunoreactivo de 50,000 daltones de peso molecular. La autorradiografía de un producto de traducción equivalente a 25µg de ARN de hipotálamo de rata (preparación 5) (figura # 8), revela la presencia de una banda radioactiva de 50,000 daltones al inmunoprecipitar con el anticuerpo anti-LHRH # 1076, la cual no es aparente al inmunoprecipitar con suero normal de conejo. Al repetir este experimento bajo las mismas condiciones pero además inmunoprecipitando los productos de traducción con anticuerpo Arimura # 743, se observa de nuevo la presencia de una banda inmunoreactiva de 50,000 daltones que es únicamente reconocida por el suero Millar # 1076 y que no es aparente cuando se utili-

za el suero Arimura # 743 o suero normal de conejo (datos no presentes)

Para observar si esta banda inmunoreactiva es desplazable por la LHRH sintética, se tradujeron 20µg de ARN de hipotálamo de ratón (preparación 2), así como ARN polisomal o la preparación de polisomas; los productos de traducción se incubaron con anticuerpo Millar # 1076 a un título final de 1:500, con o sin 10µg de LHRH. La figura # 9 muestra que hay una disminución en la intensidad de la banda que corresponde a un peso molecular de 50,000 daltones al incubar los productos de traducción con LHRH sintética. En los casos en donde la preparación de ARN presenta poca actividad en la traducción, como sucede con las preparaciones de polisomas de hipotálamo, no se observan bandas específicas ya sea en la inmunoprecipitación directa o de desplazamiento, lo que concuerda con lo que se había observado para el caso de Somatostatina (59).

Se ha reportado (18) que la placenta es un tejido rico en un péptido semejante a la LHRH, y estudios más recientes que han aislado y secuenciado un ADNc proveniente de ARNm de placenta humana (P. Seeburg, comunicación personal), postulan la existencia de un ADNc que parece codificar para un péptido precursor de LHRH de 10,000 daltones en este tejido. En base a estas evidencias se procedió a determinar si dicho péptido precursor era reconocido por el anticuerpo anti-LHRH # 1076, mediante la inmunoprecipitación de los productos de traducción del ARNm de placenta humana, o si era posible observar el péptido que es reconocible en hipotálamo de roedores. Con este propósito fueron traducidos el ARN de placenta humana y de hipotálamo de ratón bajo las mismas condiciones, y sus productos de traducción fueron inmunoprecipitados con suero # 1076 o con suero normal de conejo, ambos a un título final de 1:750. La autorradiografía (figura # 10) muestra que al inmunoprecipitar los productos de traducción de ARN de placenta humana con el suero anti-LHRH # 1076, se presenta una banda que comigra con la banda inmunoreactiva que se genera a partir de los productos de traducción de hipotálamo de ratón. En ambos casos esta señal es desplazable por suero no inmune.

Finalmente para descartar la posibilidad de reconocimiento inespecífico del suero anti-LHRH por algún producto endógeno del sistema de traducción, y que a su vez fuera desplazable por el antígeno sintético o no reconocible por el suero no inmune, se tradujeron ARN de placenta humana y de hipotálamo de ratón en extracto de germen de trigo suplementado con (^{35}S)-Metionina. En este mismo experimento se tradujo ARN de área preóptica de hipotálamo de rata. Los productos de traducción de cada ARN fueron incubados por separado con suero anti-LHRH # 1076 y con suero normal de conejo a un título final de 1:750. La figura # 11 muestra que al traducir las tres preparaciones de ARN que contienen mensaje para la síntesis de la LHRH, se genera un péptido inmunoreactivo de 50,000 daltones que es reconocido únicamente por el anticuerpo anti-LHRH # 1076. Este péptido se presenta también al traducir en lisado de reticulocito de conejo. La diferencia en la intensidad de la banda inmunoreactiva en estos tres casos se debe a la diferencia en la actividad de traducción de cada preparación de ARN.

Tabla # 1 :- Comparación entre distintas preparaciones de ARN.

Todas las titulaciones de ARN se realizan en lisado de reticulocito de conejo, realizando una curva dosis respuesta para cada preparación (25 μ Ci (35 S)-Met/ensayo). La actividad de traducción se expresa como incorporación de marca en cuentas por minuto con respecto a la incorporación basal (no ARN).

El tejido del cual se parte para la purificación de ARN proviene en todos los casos de animales macho adultos.

* Preparación de polisomas de hipotálamo de rata. Los polisomas son homogenizados en agua bidestilada estéril inmediatamente antes de la traducción.

Abreviaturas:

GnHCl .- Método de Cloruro de Guanidina.

GnSCN/CsCl.- Método de Tiocianato de Guanidina-gradiente de cloruro de cesio.

Oligo-dT .- Purificación de ARN-poli(A) por cromatografía en oligo-dT celulosa.

Poly(U) .- Cromatografía en Poly(U)-Sephadex.

| T E J I D O | METODO DE EXTRACCION | METODO DE PURIFICACION DE ARN-poli(A) | ARN TOTAL | R E N D I M I E N T O | | ACTIVIDAD DE TRADUCCION |
|------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------|-----------|------------------------------------|-----------|-------------------------|
| | | | | (μ g/g de tejido) Poli(A)+ | Poli(A)++ | |
| (1) HIPOTALAMO DE RATA (FRACCION POLISOMAL) | GnHCl | --- | --- | 50 | --- | 1.5 |
| (2) HIPOTALAMO DE RATON | GnHCl | Oligo-dT | 170 | 53 | --- | 3.2 |
| (3) HIPOTALAMO DE RATON | GnSCN/CsCl | Poly(U) | 1,000 | 150 | --- | 3.0 |
| (4) HIPOTALAMO DE RATON | GnHCl | Oligo-dT | 230 | 45 | --- | 4.2 |
| (5) HIPOTALAMO DE RATA | GnHCl | Oligo-dT | 280 | 39 | 5 | 7.0 |
| (6) CEREBRO DE RATA | GnHCl | Oligo-dT | 350 | 20 | --- | 21.0 |
| (7) PLISOMAS DE HIPOTA LAMO DE RATA * | --- | --- | --- | --- | --- | 2.0 |
| (8) PLACENTA HUMANA | GnHCl | Oligo-dT | 300 | 35 | --- | 4.0 |

Figura # 1 .- Incorporación de (³⁵S)-Metionina en Compuestos Insolubles en TCA.

El ARN-poli(A) de hipotálamo de rata (preparación 5), fue traducido en lisado de reticulocito de conejo a concentración variable de ARN.

Alícuotas de 5µl de cada mezcla de traducción fueron procesadas para la determinación de la radioactividad incorporada, que se expresa como cuentas por minuto (cpm).

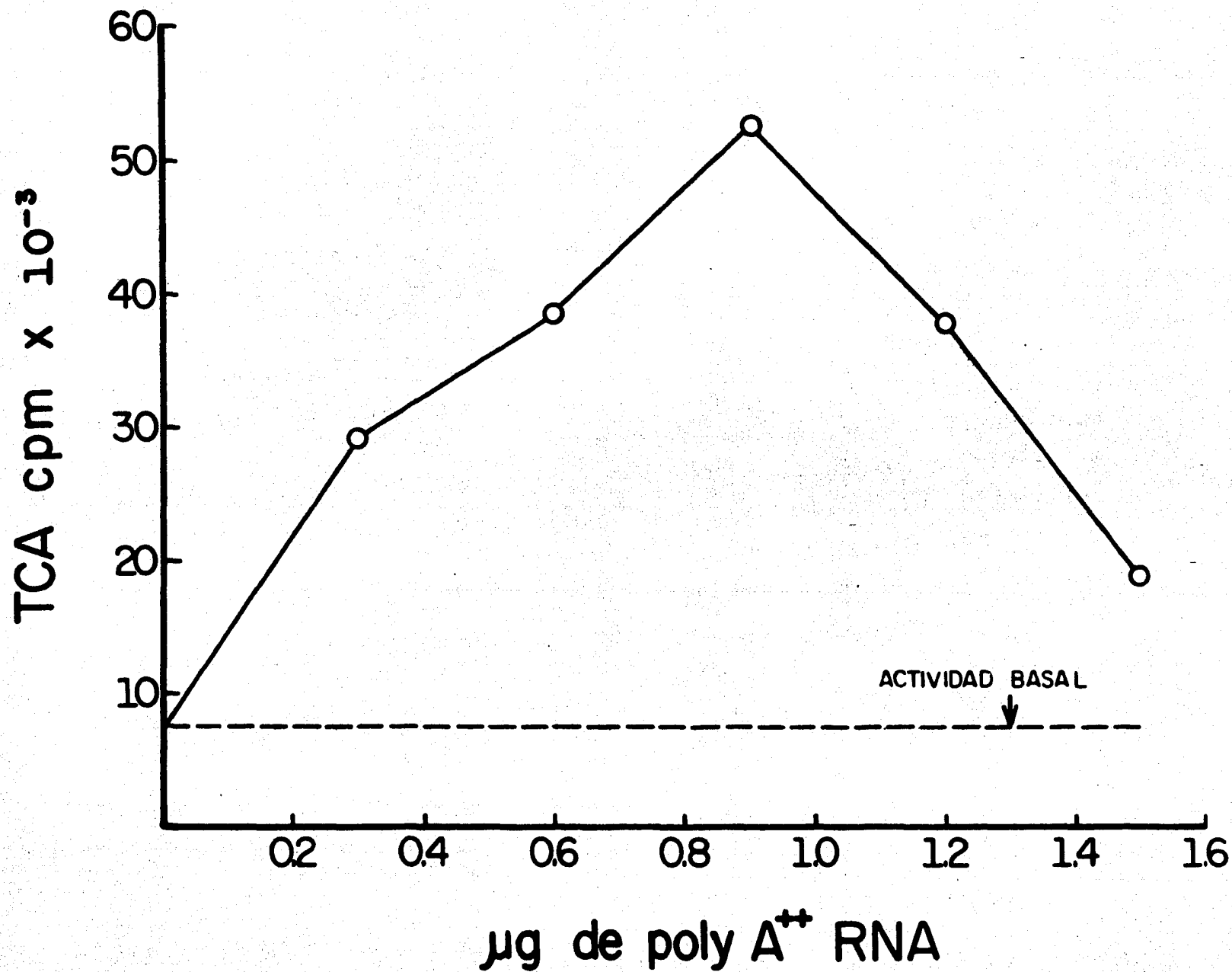


Tabla # 2 .- *Actividad de Traducción en dos Sistemas Libres de Células.*
Titulación de distintas preparaciones de ARN en Lisado de Reticulocito de Conejo y en Extracto de Germen de Trigo. Ambos sistemas de traducción fueron suplementados con 2.5 μ Ci de (35 S)-Met por ensayo. Ciertas preparaciones de ARN fueron traducidas en lisado de reticulocito de conejo suplementado con (3 H)-Leucina (25 μ Ci/ensayo).

Alícuotas de 5 μ l fueron procesadas como se describió para cada sistema de traducción. La radioactividad incorporada en proteínas precipitables por TCA es expresada como cuentas por minuto.

ARN Control .- ARNm comercial (New England Nuclear) .

No ARN.- Actividad del ARN endógeno residual del sistema de traducción.

| T E J I D O | METODO DE EXTRACCION Y PURIFICACION DE ARN-poli(A) | INCORPORACION DE RADIOACTIVIDAD EN PROTEINA PRECIPITABLE POR TCA | | |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-----------------------|
| | | Extracto de Germen de Trigo (³⁵ S)-Met | Lisado de Reticulocito de Conejo (³⁵ S)-Met | (³ H)-Leu |
| HIPOTALAMO DE RATON (Preparación 2) | GnHCl / Oligo-dT | 11,475 | 10,547 | 6,650 |
| HIPOTALAMO DE RATON (Preparación 3) | GnSCN / Poly(U) | 10,628 | 5,617 | --- |
| AREA PREOPTICA DE RATA | GnHCl / Oligo-dT | 7,945 | --- | --- |
| PLACENTA HUMANA | GnHCl / Oligo-dT | 3,620 | 12,131 | 6,896 |
| ARN CONTROL (VIRAL) | Comercial (NEN) | 2,478 | 23,879 | 6,090 |
| NO ARN | ---- | 765 | 3,821 | 2,569 |

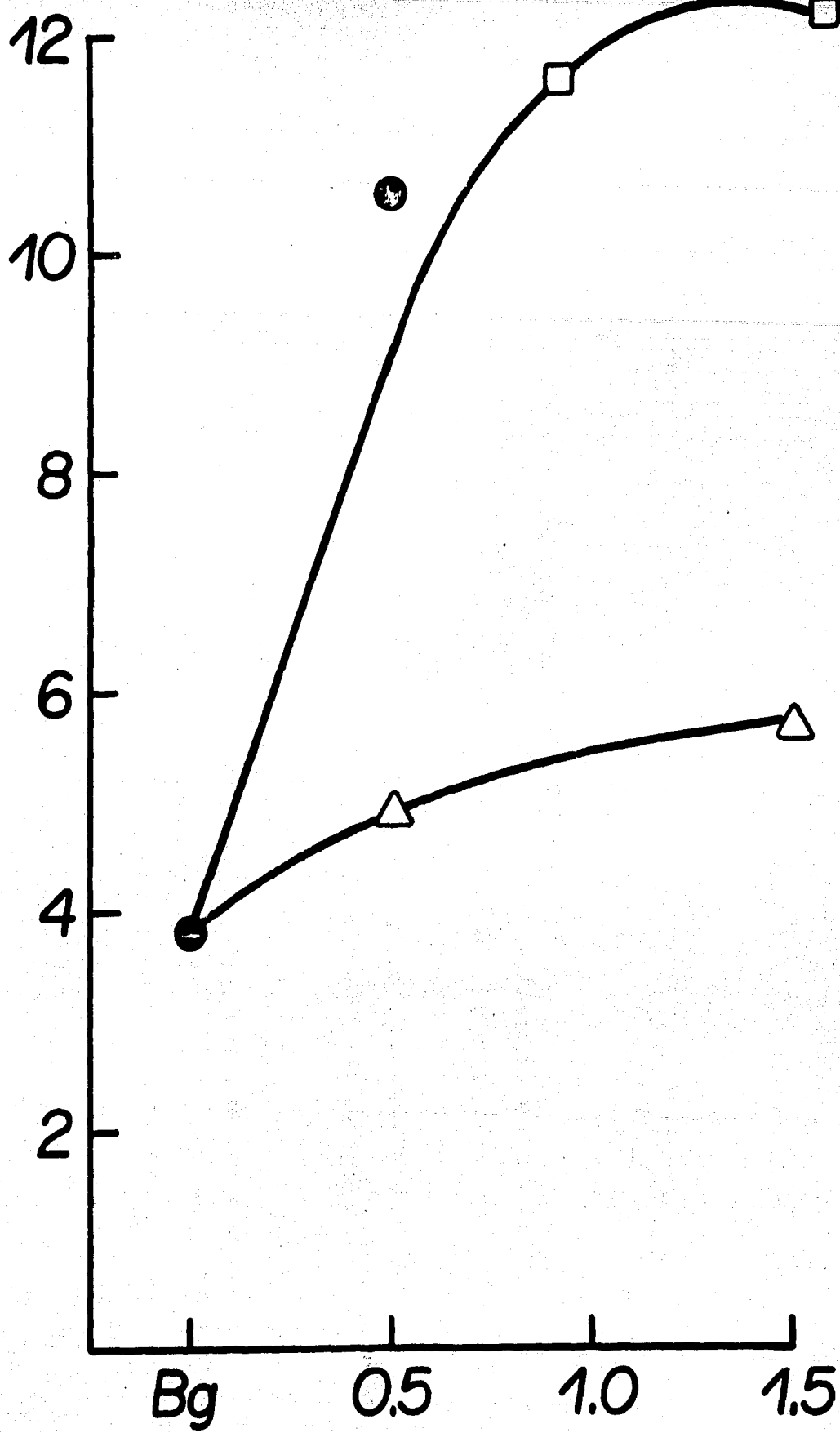
Figura # 2 A .- Traducción de ARN en Lisado de Reticulocito de Conejo.

Ciertas preparaciones de ARN (Tabla # 2) fueron traducidas en lisado de reticulocito de conejo suplementado con (^{35}S)-Metionina ($2.5\mu\text{Ci/ensayo}$).

Alícuotas de $5\mu\text{l}$ fueron procesadas como es descrito para este sistema. la radioactividad incorporada en protefnas precipitables por TCA se expresa como cuentas por minuto.

- ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2).
- ARN-poli(A) de placenta humana (preparación 8).
- △ ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 3).

$\text{cpm} \times 10^{-3} \text{ } [^{35}\text{S}]\text{-Met}$

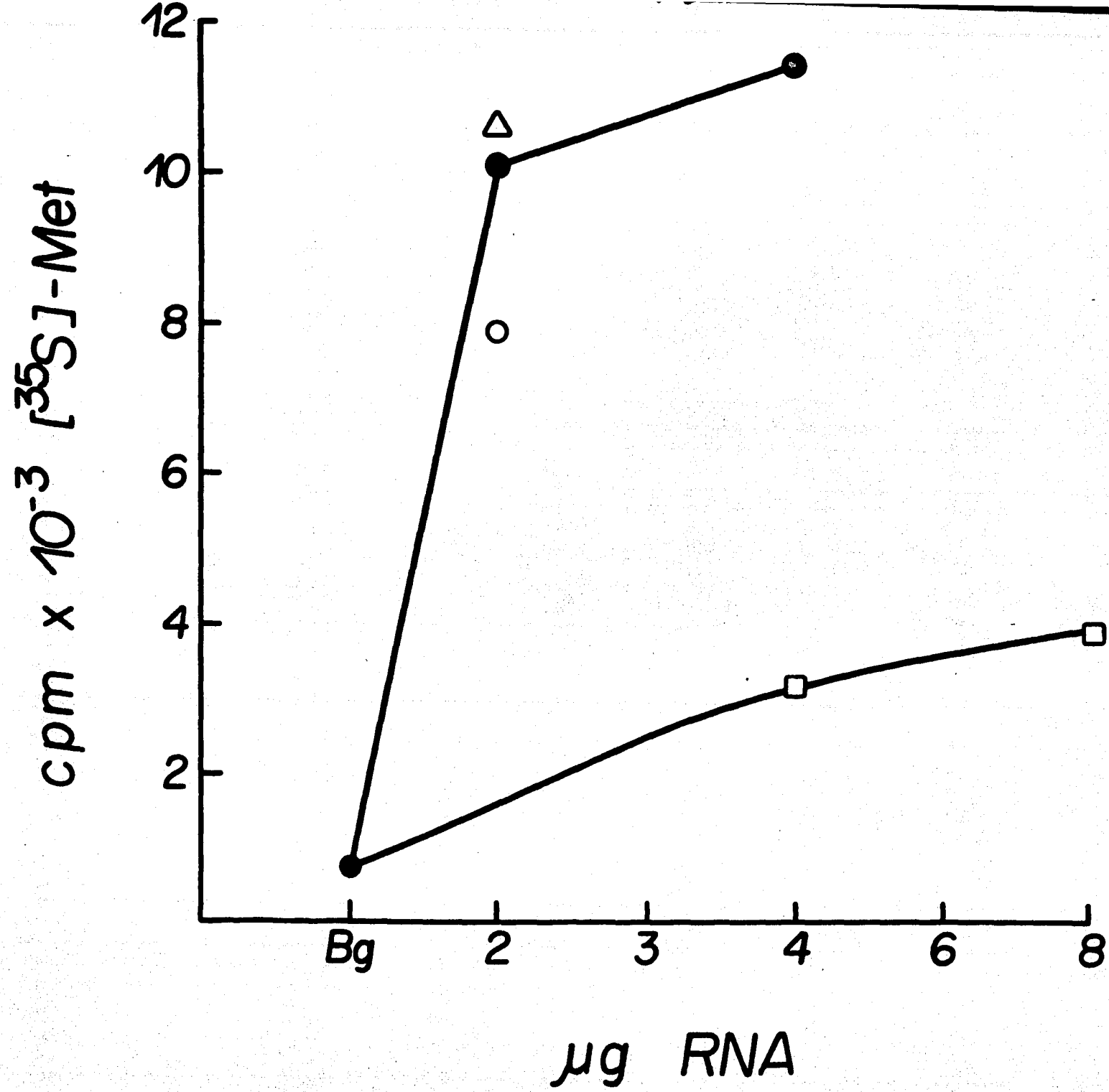


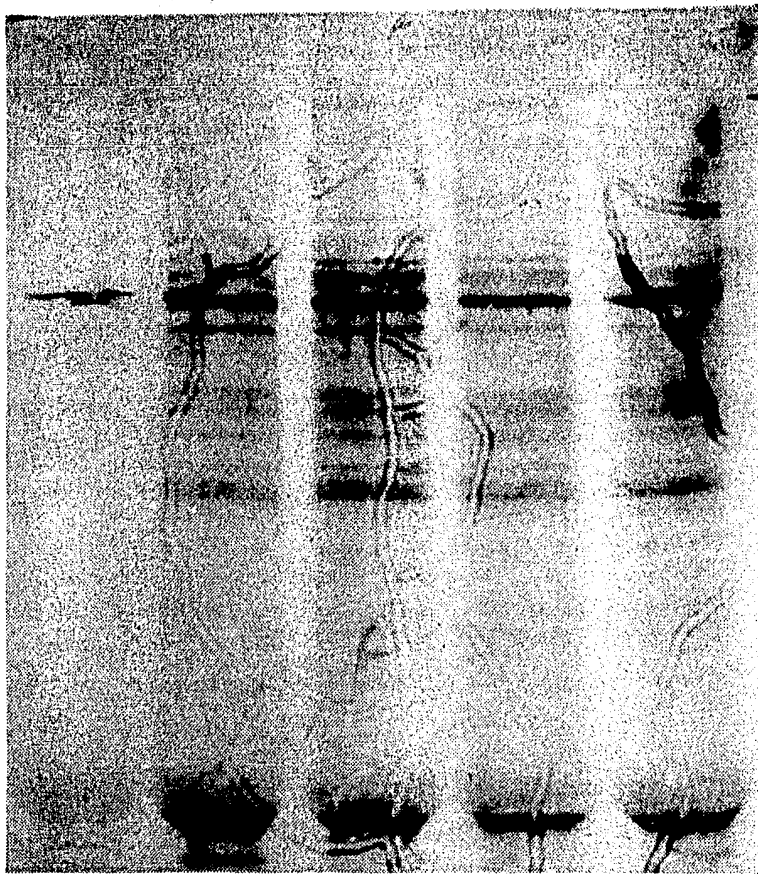
$\mu\text{g RNA (A+)}$

Figura # 2 B .- Traducción de ARN en Extracto de Germen de Trigo.

Ciertas preparaciones de ARN (Tabla # 2) fueron traducidas en extracto de germen de trigo suplementado con (^{35}S)-Metionina ($2.5\mu\text{Ci/ensayo}$). Alícuotas de $5\mu\text{l}$ fueron procesadas como es descrito para este sistema. La radioactividad incorporada en proteínas precipitables por TCA se expresa como cuentas por minuto (cpm).

- ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2).
- ARN-poli(A) de área preóptica de ratón.
- ARN-poli(A) de placenta humana (preparación 8).
- △ ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 3).





(a) (b) (c) (d) (e)

Figura # 3 .- Análisis Electroforético de Productos de Traducción Totales de ARN hipotalámico.

El ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2) fue traducido en lisado de reticulocito de conejo suplementado con $(^{35}\text{S})\text{-Met}$ ($25\mu\text{Ci/ensayo}$). $15\mu\text{l}$ de cada mezcla de reacción fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% y el gel fue tratado para fluorografía.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 5 días.

- a) No ARN
- b) $1.0\mu\text{g}$ de ARN
- c) $1.5\mu\text{g}$ de ARN
- d) $2.0\mu\text{g}$ de ARN
- e) $2.5\mu\text{g}$ de ARN

Figura # 4 .- Productos de Traducción en Lisado de Reticulocito de Conejo.

Distintas preparaciones de ARN fueron traducidas en lisado de - reticulocito de conejo suplementado con (^{35}S)-Metionina.

15 μl de la mezcla de traducción fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% y a autorradiografía, sin tratamiento previo para fluorografía.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 10 días.

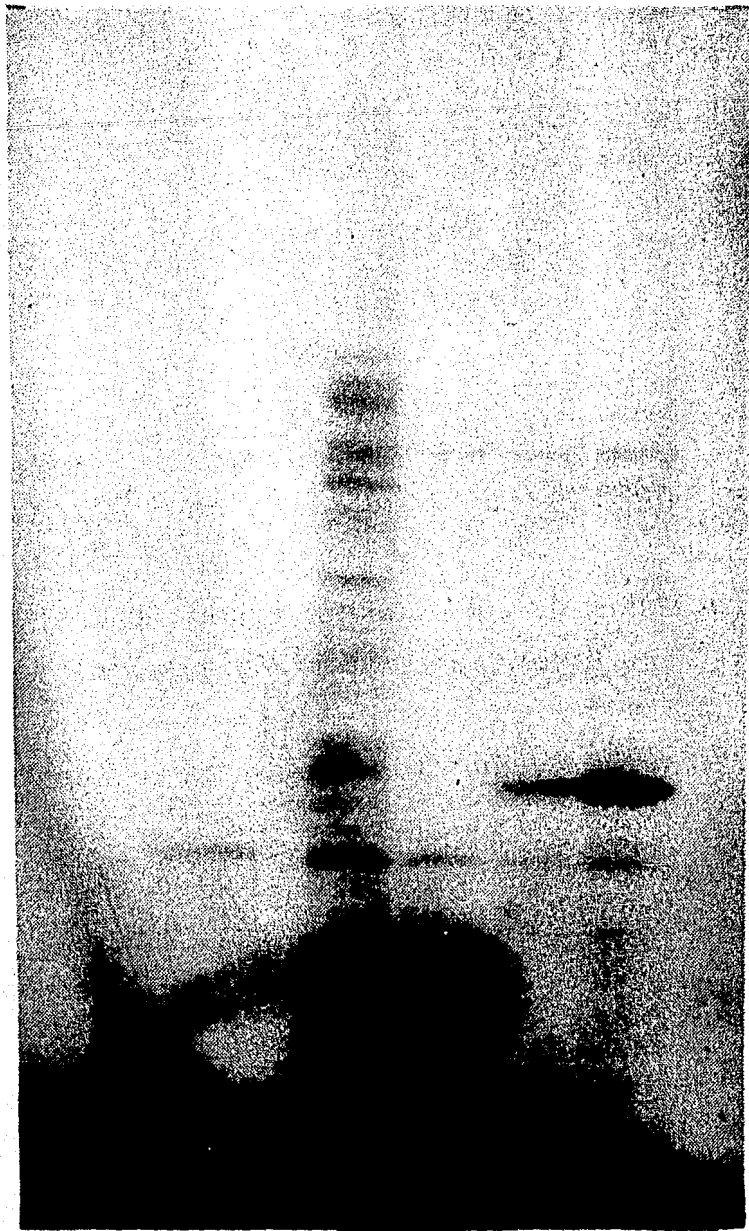
a) No ARN

b) ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2) (1 μg /ensayo).

c) ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 3) (1 μg /ensayo).

d) ARN total de placenta humana (2 μg /ensayo).

e) ARN-poli(A) de placenta humana (0.8 μg /ensayo).



(a) (b) (c) (d) (e)

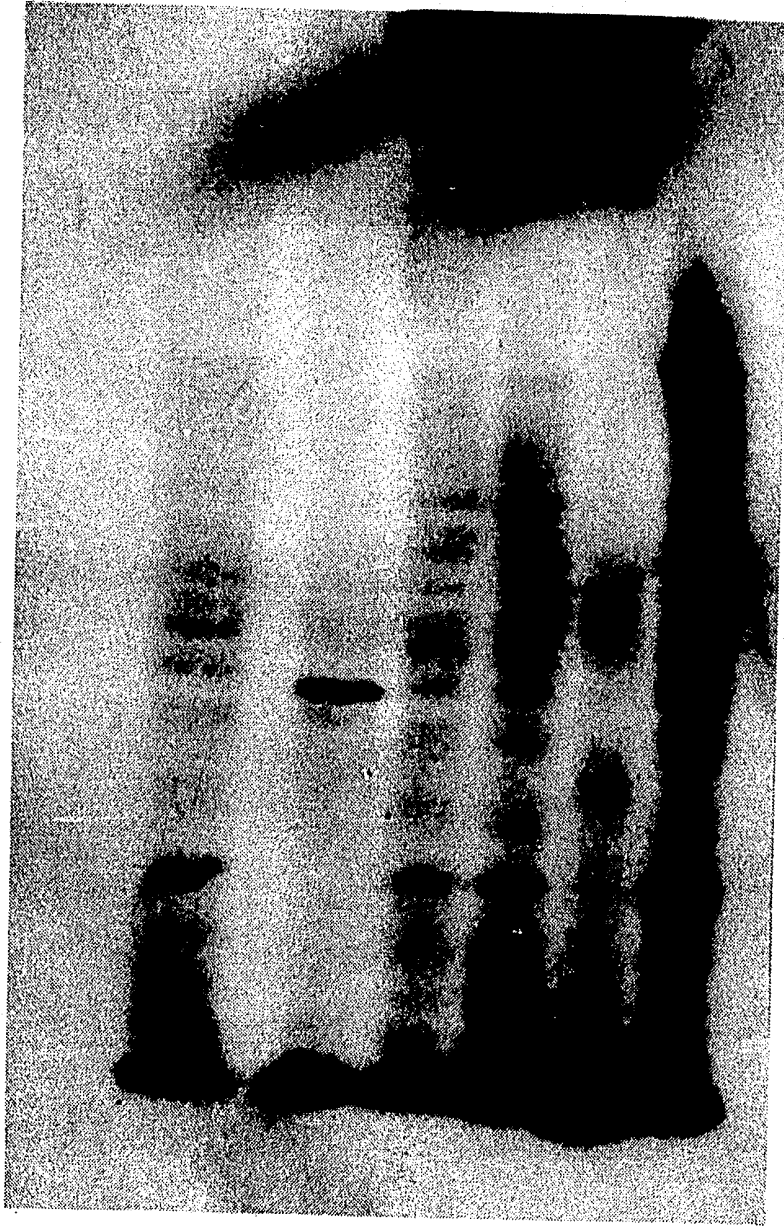
Figura # 5 .- Productos de Traducción en Extracto de Germen de Trigo.

Varias preparaciones de ARN fueron traducidas en extracto de germen de trigo suplementado con (^{35}S)-Metionina ($2.5\mu\text{Ci/ensayo}$).

15 μl de la mezcla de traducción fueron sometidos a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% y a autorradiografía, sin tratamiento previo para fluorografía.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 10 días.

- a) ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2) ($2\mu\text{g/ensayo}$).
- b) ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 3) ($2\mu\text{g/ensayo}$).
- c) ARN de área preóptica ($2\mu\text{g/ensayo}$).
- d) ARN de área preóptica ($2.5\mu\text{g/ensayo}$).
- e) ARN-poli(A) de placenta humana ($2\mu\text{g/ensayo}$).
- f) ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2) ($1\mu\text{g/ensayo}$).



(a) (b) (c) (d) (e) (f)

Figura # 6 .- Efecto de la Concentración del Ión Magnesio sobre la Actividad de Traducción.

A.- El ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 3) fue traducido a concentración variable del ión magnesio en lisado de reticulocito de conejo. La concentración de ARN empleada en este experimento fue de 0.5 μ g por mezcla de reacción.

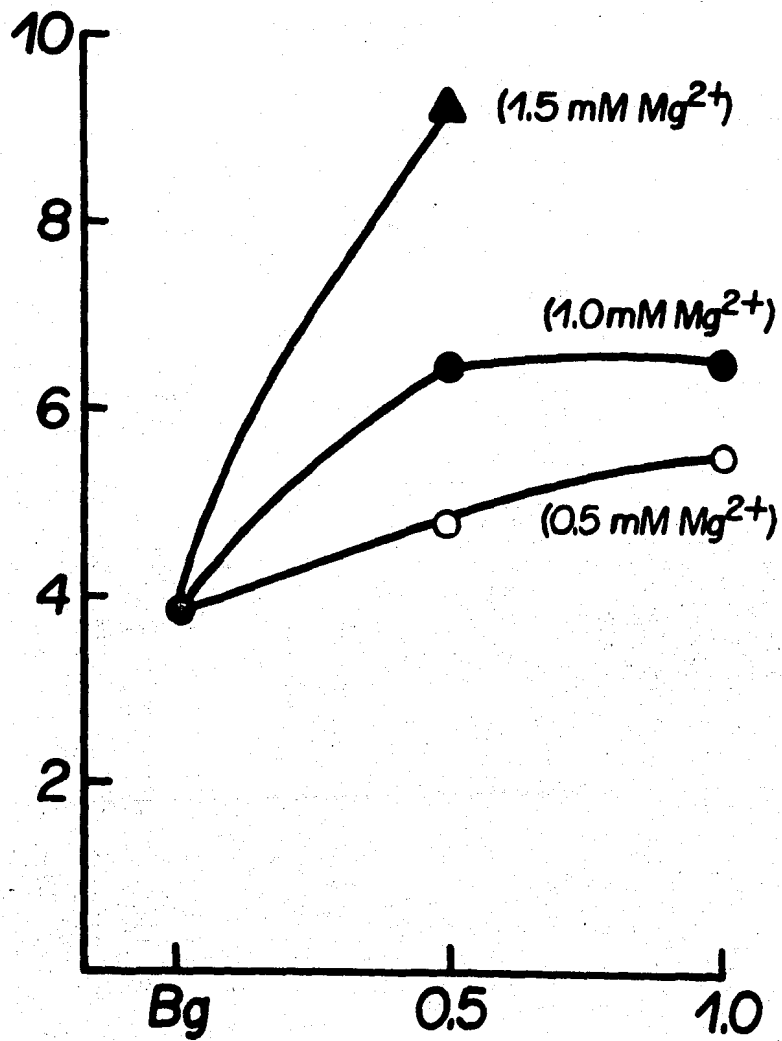
B.- Dos preparaciones de ARN fueron tituladas en lisado de reticulocito de conejo a concentración variable del ión magnesio; éstas son:

Δ ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 3) (0.5 μ g/ensayo).

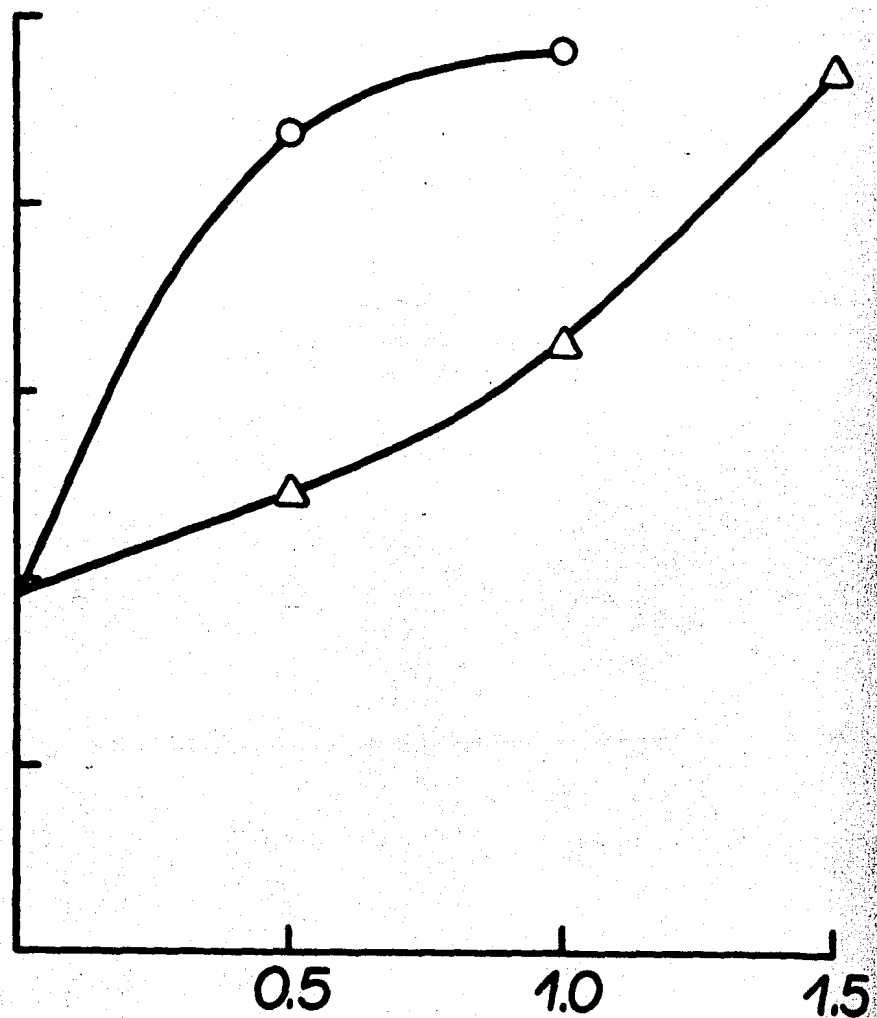
o ARN total de placenta humana (preparación 8) (2 μ g/ensayo).

La actividad de traducción se expresa como radioactividad ((35 S)-Met) incorporada en proteínas precipitables por TCA, en cuentas por minuto.

cpm x 10⁻³ [³⁵S]-Met



μg RNA



mM Mg²⁺

Figura # 7 .- Perfil Cromatográfico de la Separación de Inmuno precipitados en Proteína A-Sefarosa.

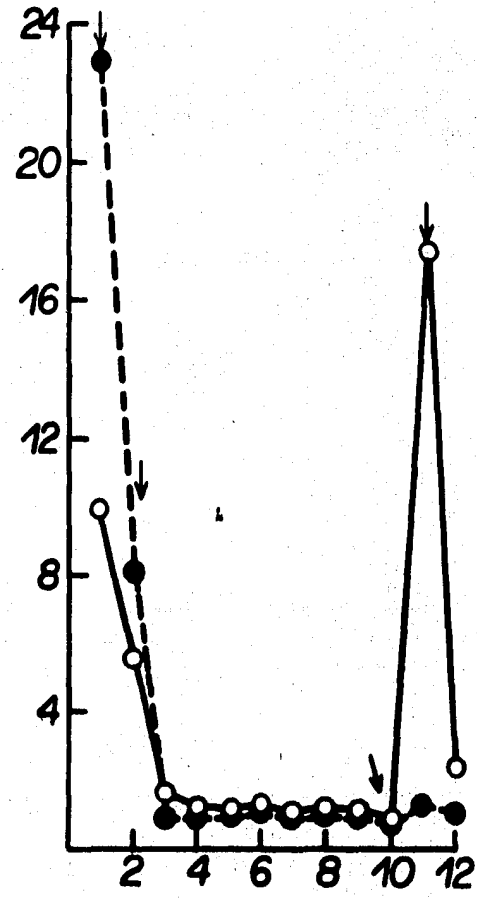
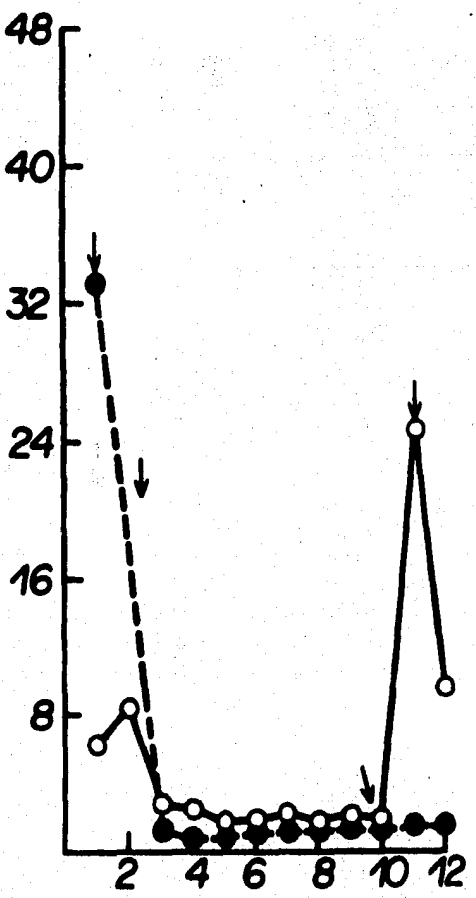
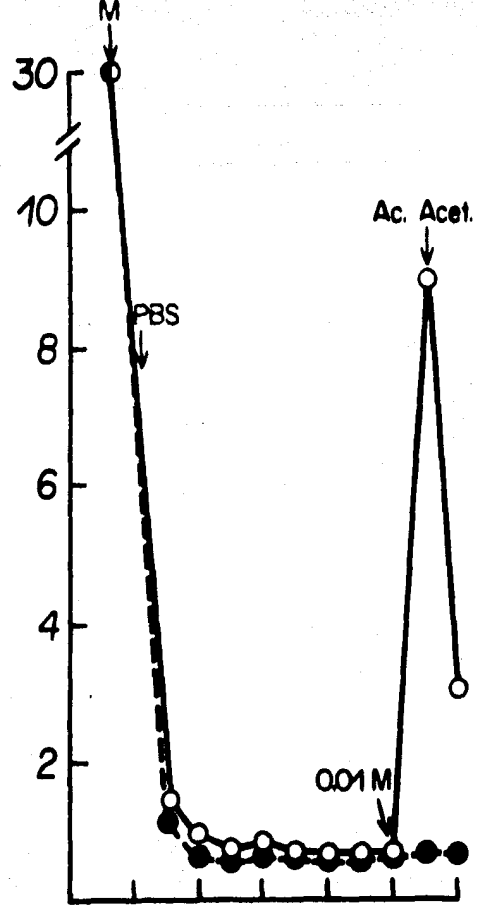
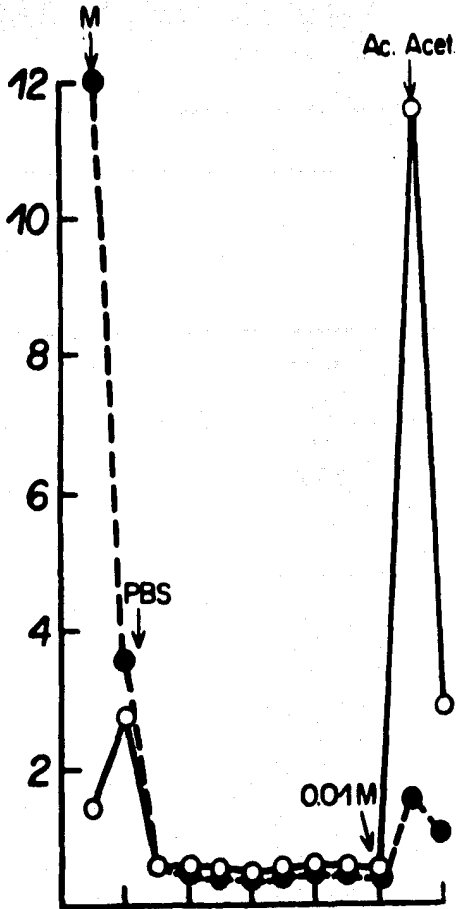
Los sueros anti-LHRH fueron incubados con (^{125}I)-LHRH en solución amortiguadora de inmunoprecipitación. El complejo antígeno-anticuerpo fue separado por cromatografía de afinidad en proteína A-Sefarosa. Fracciones de 1ml fueron colectadas para el registro de radioactividad (contador gamma) durante los lavados. El complejo antígeno-anticuerpo fue eluido en dos fracciones de ácido acético 0.1M. Como control de pegado inespecífico se utilizó suero normal de conejo.

- a) Suero Millar # 1076 .- Título final 1:1000 ; 17,677 cpm totales de (^{125}I)-LHRH. o—o anti-LHRH ; ●---● suero normal.
- b) Suero Arimura # 419 .- Título final 1:500 ; 57,000 cpm totales de (^{125}I)-LHRH. o—o anti-LHRH ; ●---● suero normal.
- c) Suero Arimura # 743 .- Título final 1:500 ; 49,000 cpm totales de (^{125}I)-LHRH. o—o anti-LHRH ; ●---● suero normal.
- d) Suero Arimura # 744 .- Título final 1:200 ; 49,123 cpm totales de (^{125}I)-LHRH. o—o anti-LHRH ; ●---● suero normal.

M.-muestra

PBS.- Fosfato de sodio 0.5M pH8.0, cloruro de sodio 0.15M.
0.01M.- Fosfato de sodio 0.01M.
Ac. Acet.- Acido acético 0.1M.

$[^{125}\text{I}]$ - LHRH



F R A C C I O N

S U E R ORADIOACTIVIDAD INMUNOPRECIPITABLE

+ LHRH

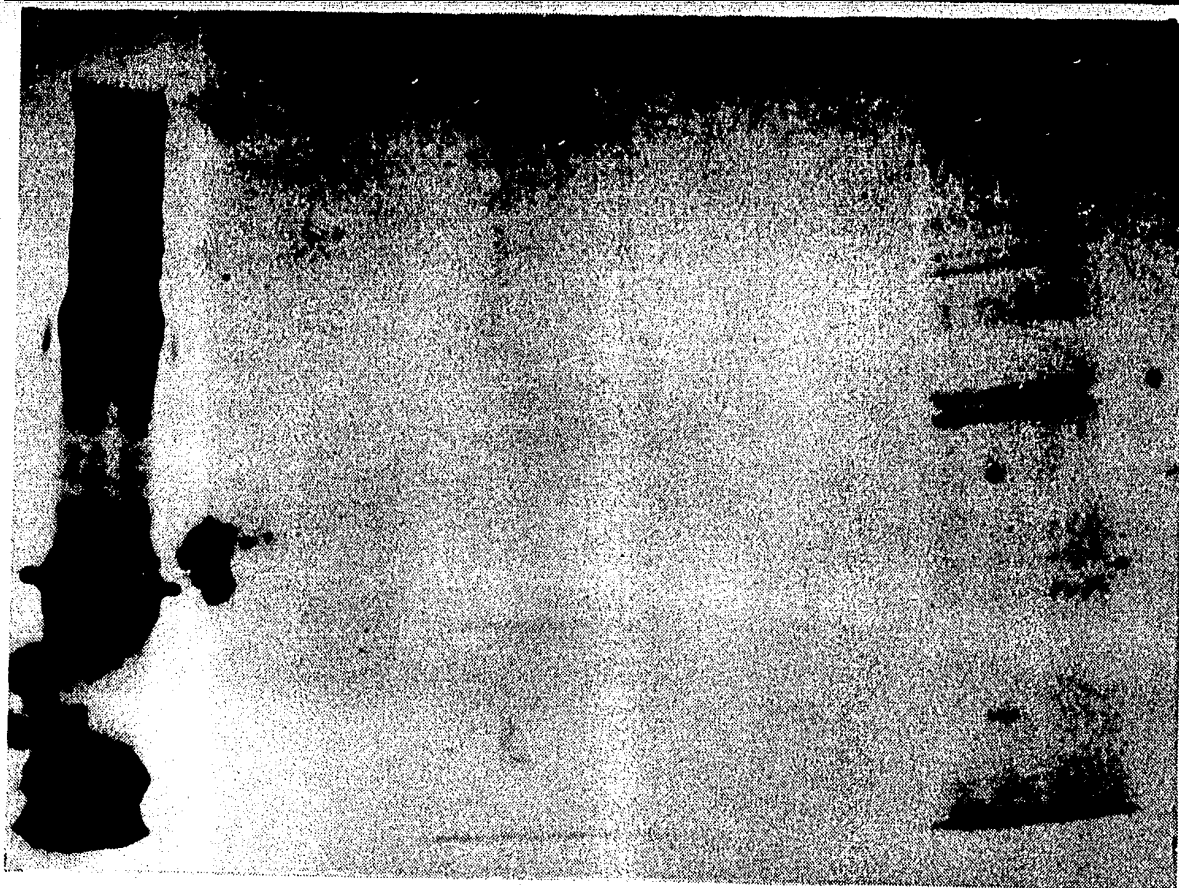
| | | |
|---------------------------|-------|-------|
| SUERO NORMAL DE CONEJO | 1,377 | 820 |
| MILLAR # 1076 | 3,186 | 1,159 |
| ARIMURA # 743 | 1,008 | 620 |
| ARIMURA # 744 | 1,600 | 1,200 |
| ARIMURA # 419 | 2,003 | 1,387 |

Tabla # 3 .- Inmunoprecipitación de Productos de Traducción por distintos Anticuerpos.

Los productos de traducción de 32 μ g de ARN de hipotálamo de rata (preparación 5), fueron incubados con distintos sueros anti-LHRH en presencia y ausencia de 10 μ g de LHRH.

Todos los sueros fueron probados a un título final de 1:2000.

La radioactividad inmunoprecipitable se expresa como cuentas por minuto (cpm).



(a)

(b)

(c)

Figura # 8 .-Autorradiografía de Productos de Traducción Inmuno precipitados.

El ARN-poli(A) de hipotálamo de rata (preparación 5) fue traducido en su óptima concentración en lisado de reticulocito de conejo, y los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con anti-LHRH Millar # 1076 o con suero normal de conejo. El inmunoprecipitado fue separado por cromatografía en Proteína A Sefarosa, y las fracciones de ácido acético fueron liofilizadas y sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12%.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 3 semanas.

a) Marcadores de peso molecular (^{14}C - metilados)

Albúmina sérica bovina 68,000 daltones.

Anhidrasa carbónica 30,000 daltones.

β -lactoglobulina 18,000 daltones.

Citocromo C 12,500 daltones

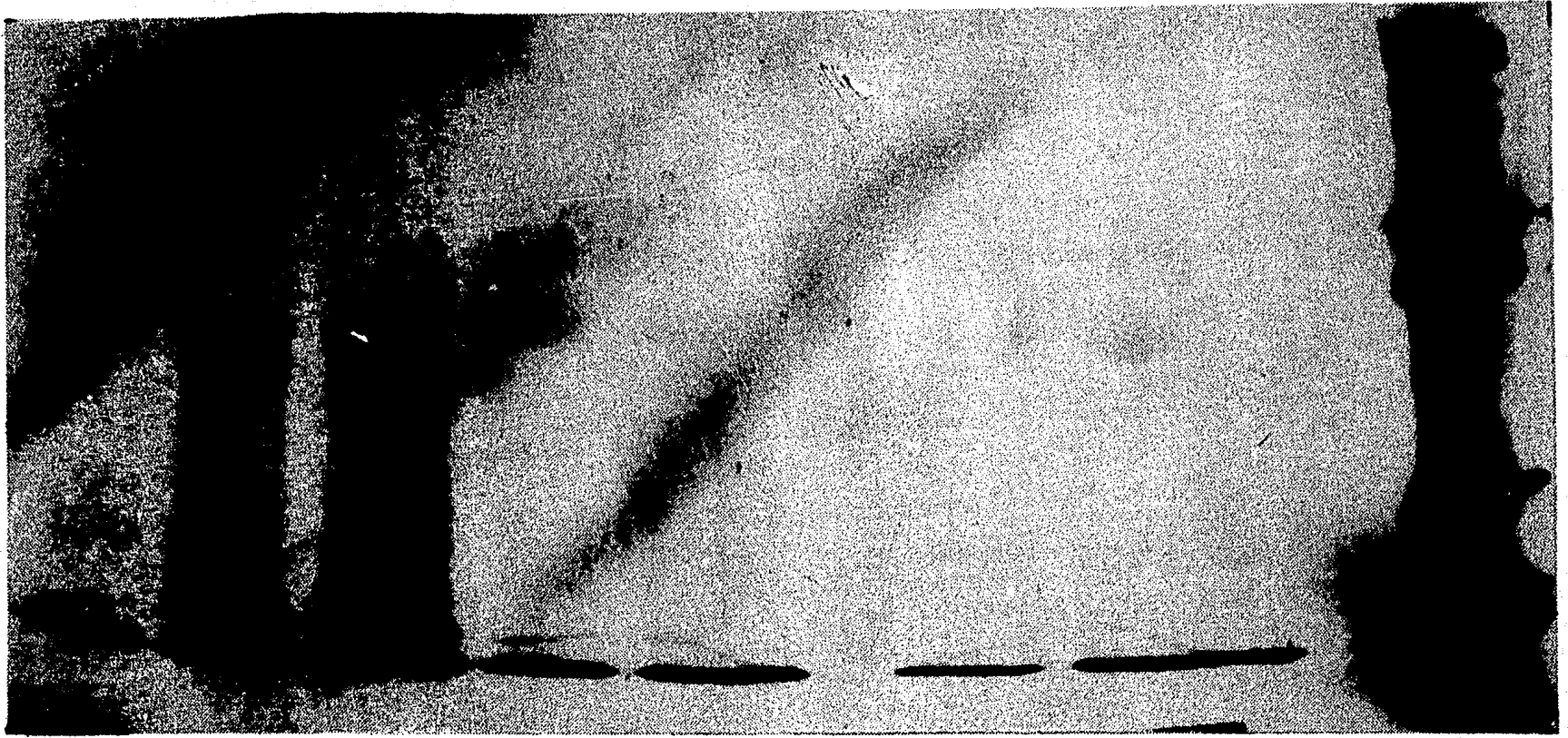
b) Inmunoprecipitación con suero normal de conejo (1:500).

c) Inmunoprecipitación con anti-LHRH Millar # 1076 (1:500).

Figura # 9 .- Autorradiografía de Productos de Traducción Inmunoprecipitados.
El ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2); el ARN polisomal (preparación 1); y los polisomas de hipotálamo de rata (preparación 7), fueron traducidos en lisado de reticulocito de conejo suplementado con (^{35}S)-Metionina. Los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con anti-LHRH Millar # 1076 con o sin $10\mu\text{g}$ de LHRH sintética.

- a) Productos endógenos del sistema de traducción +anti-LHRH Millar # 1076.
- b) Productos del ARN-poli(A) + anti-LHRH Millar # 1076 + LHRH.
- c) Productos del ARN-poli(A) + anti-LHRH Millar # 1076.
- d) Productos del ARN polisomal + anti-LHRH Millar # 1076 + LHRH.
- e) Productos del ARN polisomal + anti-LHRH Millar # 1076.
- f) Productos de los polisomas de hipotálamo + anti-LHRH Millar # 1076 + LHRH.
- g) Productos de los polisomas de hipotálamo + anti-LHRH Millar # 1076.
- h) Marcadores de peso molecular.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 3 semanas.



(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

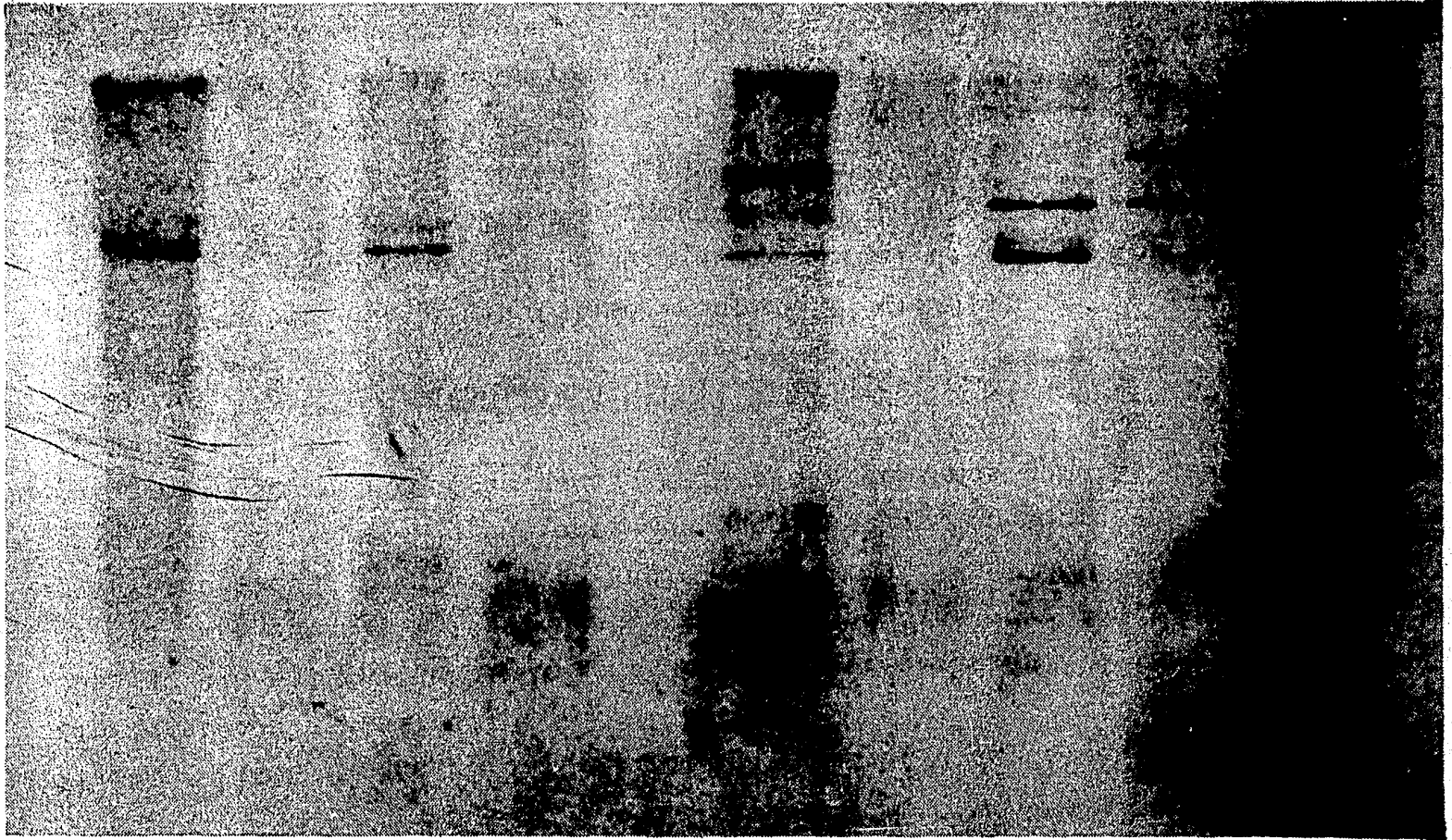
(h)

Figura # 10 .- Autorradiografía de Productos de Traducción Inmunoprecipitados.
10 μ g de ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2) y 16 μ g de ARN-poli(A) de placenta humana (preparación 8) fueron traducidos en lisado de reticulocito de conejo. Los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con anti-LHRH Millar # 1076 o con suero normal de conejo a un título final de 1:750.

Los sobrenadantes de los productos de traducción previamente adsorbidos con suero normal de conejo se reincubaron con suero Millar # 1076 o con suero normal de conejo.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 20 días.

- a) Productos de ARN de hipotálamo + anti-LHRH.
- b) Productos de ARN de hipotálamo + suero normal de conejo.
- c) Productos de ARN de placenta humana + anti-LHRH.
- d) Productos de ARN de placenta humana + suero normal de conejo.
- e) Productos de ARN de hipotálamo, reincubados con anti-LHRH.
- f) Productos de ARN de hipotálamo, reincubados con suero normal de conejo.
- g) Productos de ARN de placenta, reincubados con anti-LHRH.
- h) Productos de ARN de placenta, reincubados con suero normal de conejo.
- i) Marcadores de peso molecular.



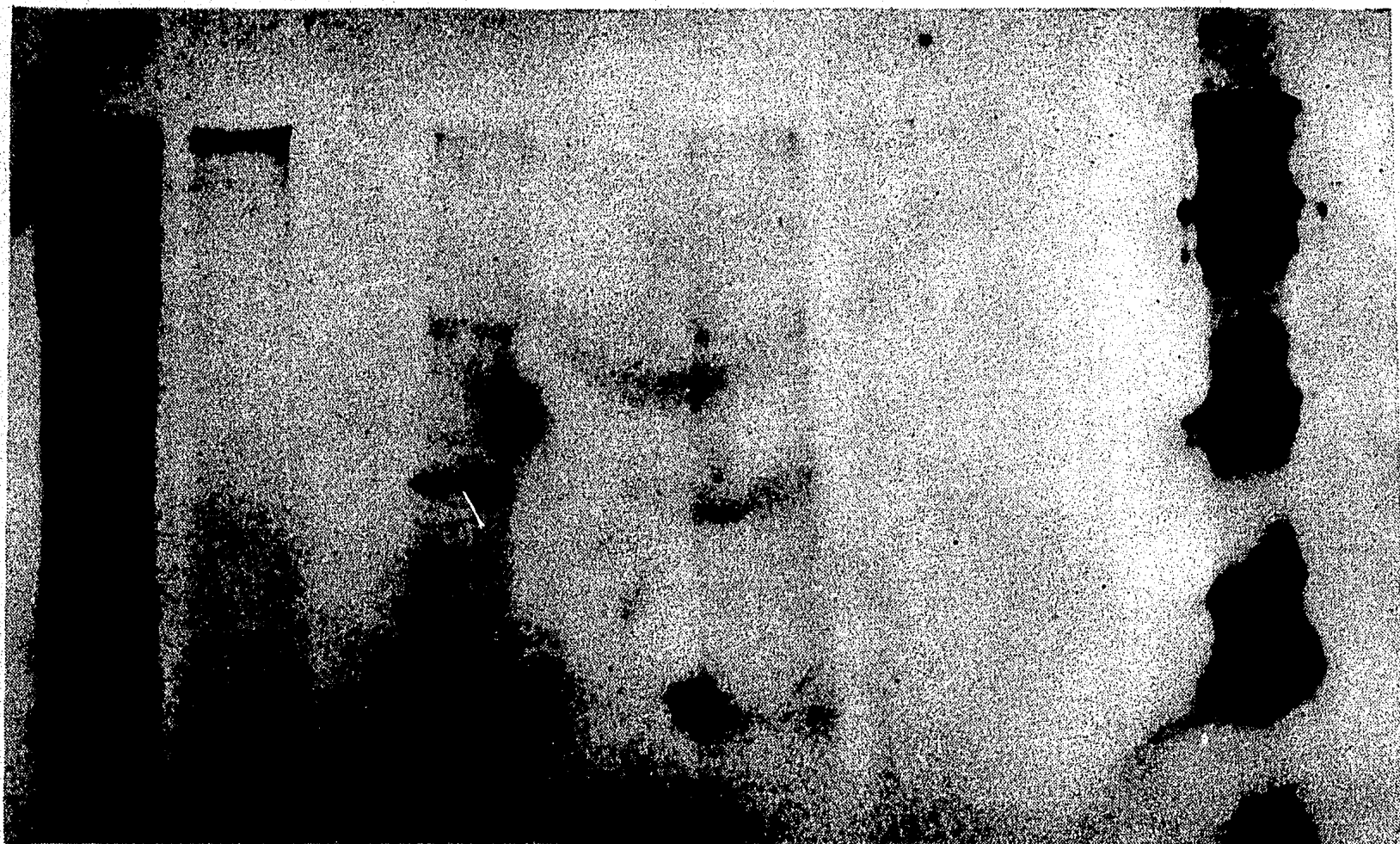
(a) (b) (c) (d) (e) (f) (g) (h) (i)

Figura # 11 .- Productos de Traducción en Extracto de Germen de Trigo, Inmunoprecipitados con un anticuerpo anti-LHRH.

20 μ g de ARN-poli(A) de hipotálamo de ratón (preparación 2), 16 μ g de ARN-poli(A) de placenta humana, y 14 μ g de ARN de área preóptica de ratón, fueron traducidos en extracto de germen de trigo suplementado con 250 μ Ci de (³⁵S)-Metionina. Los productos de traducción fueron inmunoprecipitados con suero anti-LHRH Millar # 1076 o con suero normal de conejo y fueron procesados como es descrito anteriormente.

Tiempo de exposición a autorradiografía; 20 días.

- a) Productos de ARN de hipotálamo + anti-LHRH (1:750).
- b) Productos de ARN de hipotálamo + suero normal de conejo (1:750).
- c) Productos de ARN de placenta humana + anti-LHRH (1:750).
- d) Productos de ARN de placenta humana + suero normal de conejo (1:750).
- e) Productos de ARN de área preóptica + anti-LHRH (1:750).
- f) Productos de ARN de área preóptica + suero normal de conejo (1:750).
- g) Marcadores de peso molecular.



(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

(g)

V. DISCUSION DE RESULTADOS.

Si bien la existencia de un precursor de LHRH en hipotálamo ha sido propuesta, la identidad de éste es aún desconocida. Varios autores siguiendo diversas estrategias experimentales han reportado diferentes pesos moleculares o moléculas reconocidas por anticuerpos anti-LHRH.

En este trabajo se obtuvo evidencia para la existencia de un polipéptido de 50,000 daltones como producto directo de la traducción de ARN mensajero de hipotálamo. Este producto inmunoprecipitado con el anticuerpo # 1076 de R. Millar (40) utilizado también por dicho investigador en homogenados de hipotálamo, cumplió en nuestro sistema con varios requisitos de especificidad: es desplazable por LHRH sintética, no es reconocido por suero no inmune u otros anticuerpos. De acuerdo a las características de reconocimiento antigénico de los anticuerpos # 743 o # 419 hubieramos esperado que estos inmunoprecipitaran también un péptido que se observara como una banda. Sin embargo, esto puede ser explicado por un problema de afinidad, y que dentro de un precursor tan grande estos anticuerpos no lo reconocieran.

Nuestros resultados difieren de los del grupo de G. Fink (42), quienes utilizando el mismo enfoque de traducción *in vitro* del ARN mensajero de hipotálamo de rata, no observan

señal alguna cuando se utiliza metionina radioactiva en el sistema de traducción, y sí uno de 28,000 daltones al incubar en presencia de (³H)-Leucina. A este respecto existe una fuerte evidencia de que la metionina es el primer aminoácido en la síntesis de proteínas en eucariotes (78); el no detectarla significaría que G. Fink observa un producto degradado del precursor. Esta degradación pudiera ser específica, es decir, por proteasas procesadoras traducidas también en el sistema o bien, por proteasas endógenas del reticulocito, aunque esto es poco probable, ya que se ha reportado que el reticulocito posee muy poca actividad proteolítica (74). Si las enzimas procesadoras fueran sintetizadas en el sistema, nosotros no observaríamos una banda al utilizar metionina radioactiva, sin embargo, si la observamos. Puesto que no hay reportes en cuanto a la caracterización del suero utilizado por G. Fink, no podemos analizar si es un problema de especificidad del anticuerpo. Este problema también es discutible en nuestros resultados. Sin embargo, el hecho de que se observe una banda inmunoreactiva al traducir ARNm proveniente de la región hipotalámica que se traduce ya sea en reticulocito o en germen de trigo, y es observada sólo en aquellas preparaciones que muestran una alta capacidad de traducción, nos hacen confiar en estos resultados. Evidencia adicional se obtuvo cuando el sobrenadante de los productos de traducción, previamente inmunoprecipitados con suero normal de conejo, se incubó con el suero # 1076 y se observó de nuevo la banda.

Ahora bien, durante el transcurso de este trabajo surgió la primera evidencia concluyente de la caracterización del precursor de LHRH presente en placenta humana. P. Seeburg (comunicación personal) utilizando oligonucleótidos sintéticos como rastreadores en un banco de ADNc de placenta humana, identificó una clona cuya secuencia contenía la secuencia "señal" característica de proteínas secretadas, la de la LHRH seguida de aminoácidos básicos Lys-Arg que se sabe son la señal para proteínas procesadoras, y otros péptidos de función desconocida. Este polipéptido corresponde a un peso molecular de 10,000 daltones.

En base a esta evidencia, aislamos ARN mensajero de placenta humana y se tradujo en ambos sistemas. Como se mencionó en la sección de resultados no se observó una banda de 10,000 daltones y sí nuevamente la de 50,000 daltones. Esto sugiere que, o bien, pese a los criterios de especificidad empleados, el anticuerpo # 1076 reconoce algo más, semejante a LHRH pero no necesariamente el precursor del péptido, o que existen dos productos génicos diferentes, uno dando origen a una molécula de 10,000 y otro de 50,000 daltones. A este respecto existen varias evidencias que demuestran la existencia de más de un gen que codifica para un mismo neuropéptido (79). Más aún, se ha observado que existe un tipo distinto de LHRH en testículo de rata al que se encuentra en hipotálamo (80), y se han determinado dos tipos distintos de la LHRH en hipotálamo de gallina (81).

La existencia de dos genes facilitaría incluso la comprensión del complicado sistema de regulación del eje neuroendócrino hipotálamo-hipofisiario-gonadal, sin embargo, por el momento queda a nivel especulativo, y sólo la secuencia completa del precursor de LHRH hipotalámico dará la respuesta. Hasta el momento no se ha podido identificar el ADNc de hipotálamo (P. Seeburg, comunicación personal) y esto puede ser debido a la baja proporción en la que se encuentra éste (o éstos) ARNm en un tejido de alta heterogeneidad como el cerebro. De hecho, sólo dos precursores peptídicos se han logrado identificar en Sistema Nervioso Central después de intenso trabajo, el del CRF (82) y el de la Sustancia P (83). El hecho de tener la información sobre el peso molecular de un precursor de LHRH nos permite ahora plantear estrategias de enriquecimiento del ARN (por separación electroforética del ARN mensajero en el rango de 450 a 2000 base nucleotídicas, que correspondería a la síntesis de productos peptídicos de 10,000 a 50,000 daltones. Con una población de ARN mensajero ya enriquecida, se piensa formar un banco de clones de ADNc de hipotálamo de roedor, en el cual se rastreará el ADNc del mensajero que codifica para la LHRH, lo que permitirá estudios posteriores de regulación.

VI. APENDICES.

A. ABREVIATURAS.

| | |
|----------------|-------------------------------------------------------------|
| ACTH | Hormona Adrenocorticotrópica. |
| bis-Acrilamida | N,N' Metilen-bis-acrilamida. |
| ADN | Acido desoxirribonucleico. |
| ADNc | ADN complementario al ARN mensajero. |
| AMP | Adenosin-monofosfato. |
| ARN | Acido ribonucleico. |
| ARNm | ARN mensajero. |
| ARN-poli(A) | ARN mensajero con cadenas poliadenina en el extremo 3'. |
| CRF | Factor Liberador de la Corticotropina. |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DTT | Ditiotreitol. |
| EDTA | Acido etilen-diamino-tetracético. |
| EGTA | Acido etilenglicol-bis(β aminoetileter) tetracético. |
| GRF | Factor Liberador de la Hormona del <u>Cre</u> cimiento.. |
| HEPES | Acido N-2-hidroxietilenpiperazin N'-2-etansulfónico. |
| LHRH | Hormona Liberadora de la Hormona Lutei <u>nizante</u> . |
| PPO | 2,5, Difeniloxasol. |
| SDS | Dodecil sulfato de sodio. |

| | |
|-------|---------------------------------------|
| TCA | Acido tricloroacético. |
| TEMED | N,N,N',N' Tetrametiletilendiamina. |
| TRH | Hormona Liberadora de la Tirotropina. |

B. REACTIVOS.

| | |
|------------------------------------------------------|------------------------|
| Acrilamida | Bio-Rad Laboratories. |
| bis-Acrilamida | Bio-Rad Laboratories. |
| Albúmina sérica bovina (grado radioinmunoensayo) | Sigma Chemical Co. |
| Albúmina sérica bovina ((¹⁴ C)-Metil) | New England Nuclear. |
| Anhidrasa carbónica ((¹⁴ C)-Metil) | New England Nuclear. |
| Aminoácidos | Merck. |
| ATP | Sigma Chemical Co. |
| Azida de sodio | Sigma Chemical Co. |
| Azul de bromofenol | Sigma Chemical Co. |
| Azul de Coomassie | Sigma Chemical Co. |
| Cloruro de cesio | Sigma Chemical Co. |
| Creatin fosfocinasa | P.L. Biochemicals Inc. |
| Ditiotreitol | Sigma Chemical Co. |
| EDTA | Sigma Chemical Co. |
| EGTA | Sigma Chemical Co. |
| Fluoruro de fenil metil - sulfonilo (PMSF) | Sigma Chemical Co. |
| Formamida | Bio-Rad Laboratories. |
| Fosfato de creatina | P.L. Biochemicals Inc. |
| GTP | Sigma Chemical Co. |

| | |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Cloruro de Guanidina | Pierce. |
| Tiocianato de Guanidina | Fluka A.G. |
| Hemina | Eastman Labs. |
| Heparina | Sigma Chemical Co. |
| ¹²⁵ I | New England Nuclear |
| β-lactoglobulina | New England Nuclear |
| ((¹⁴ C)-Metil) | |
| Lauril sarcosianato de sodio | Sigma Chemical Co. |
| LHRH | Peninsula laboratories. |
| Lisosima ((¹⁴ C)-Metil) | New England Nuclear. |
| (³⁵ S)-Metionina | New England Nuclear. |
| Nucleasa micrococcal | Sigma Chemical Co. |
| Oligo-dT celulosa | Collaborative Research. |
| Persulfato de amonio | Sigma Chemical Co. |
| Proteína A-Sefarosa | Sigma Chemical Co. |
| Poly(U)-Sephadex | Bethesda Research Labs. |
| Ribonucleasa (páncreas bovino) | P.L. Biochemicals Inc. |
| SDS | Bio-Rad Laboratories. |
| Spermidina | Sigma Chemical Co. |
| TEMED | Bio-Rad Laboratories. |

C. EQUIPO.

| | |
|--------------------------------|------------------------------|
| Agitador magnético | TriR Magnetic Stirrer. |
| Agitador Vortex | Vortex Genie TM. |
| Autoclave | American Cyclomatic Control. |
| Balanza analítica | Mettler H54AR. |
| Balanza granataria | Ohaus Harvard Trip. |
| Cámara para electroforesis | Bio-Rad Labs. |
| Centrífuga | Beckman JS20. |
| Centrífuga | Beckman Microfuge B. |
| Congelador (-20°C) | IEM de Luxe. |
| Contador para radicación gamma | Gamma 5500. |
| Contador para radiación beta | Packerd Tri-Carb 3390. |
| Espectrofotómetro | Spectronic 710. |
| Evaporador | Savant RH40-11. |
| Fuente de poder | Isco 494. |
| Homogenizador mecánico | Bellco Glass Inc. |
| Homogenizador tipo Dounce | Wheaton Scientific. |
| Homogenizador tipo Polytron | Brinkman Instruments Co. |
| Horno | Aparatos de Laboratorio BG. |
| Potenciómetro | Beckman Selection 2000. |
| Refrigerador (4°C) | IEM de Luxe. |
| Secador de geles con vacío | Bio-Rad Labs. |
| Tanque de Nitrógeno líquido | Orion ET 17 Cryogenics. |
| Ultracentrífuga | Beckman L8-55. |
| Ultracongelador (-70°C) | Kelvinator Series 100. |

VII. REFERENCIAS.

- 1.- Truex, R.C. and Carpenter M.B. (1969) *Human Neuroanatomy* The Williams and Williams Co. Baltimore . 39-41 y 488-497.
- 2.- Green, J.D. and Harris, G.W. (1947) The neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J. Endocrinol.* 5: 136-146.
- 3.- Labrie, F., Raymond, V. *et al.* Mechanism of action of hypothalamus hormones in the anterior pituitary gland and specific modulation of their activity by sex steroids and thyroid hormones. *Recent Prog. Horm. Res.* 34: 25-81 (1978).
- 4.- Schally, A.V., Bowers, C.Y. and Redding, T.W. (1966) Purification of thyrotropic hormone releasing factor from bovine hypothalamus. *Endocrinology* 78: 726-732.
- 5.- Guillemin, R. *et al.* (1963) In vitro secretion of thyrotropin (TSH): stimulation by an hypothalamic peptide (TRF). *Endocrinology* 73: 564-572.
- 6.- Nair, R.M.G. *et al.* (1970) Structure of porcine thyrotropin releasing hormone. *Biochemistry* 9: 1103-1106.
- 7.- Schally, A.V., Nair, R.M.G., Redding, T.W., Arimura A. (1971) Isolation of the luteinizing hormone and follicle stimulin hormone-releasing hormone from porcine hypothalamus. *J. Biol. Chem.* 246: 7230-7236.

- 8.- Martin, J.B. (1976) Brain regulation of growth hormone secretion. In: *Frontiers in Neuroendocrinology*. L. Martin and W.F. Ganong (eds.) Vol. 4 Raven Press, New York 129-168.
- 9.- Brazeau, P. *et al.* (1973) Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone. *Science* 179: 77-79.
- 10.- Vale, W., Spiers, J., Rivier, C., Rivier, J. (1981) Characterization of a 41 residues ovine hypothalamic peptide that stimulates secretions of corticotropin and β -endorphin. *Science* 213: 1394-1397.
- 11.-Rivier, J., Spres, J., Thorner, M., and Vale W. (1982) *Nature* 300: 276-278.
- 12.-Gullemin R., Brazeau P., Bohlen P., Esch F., Ling N., Wehsenberg W.B., (1982) Growth hormone-releasing factor from human pancreatic tumor that causes acromegaly. *Science* 218: 585-587.
- 13.-Schally A.V., Arimura A., Baba Y., Nair R.M.G., Matsuo H., Redding T.W., Debeljuk L. and White W.F. (1971) Isolation and properties of the FSH and LH releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 393-399.
- 14.-Matsuo H., Baba Y., Nair R.M.G., Arimura A. and Schally A.V. (1971) Structure of the porcine LH and FSH releasing hormone. Part I The proposed aminoacid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43; 1334-1339.
- 15.-Gautron J.P. Pattou E., and Kordon C. (1977) New data on subcellular distribution of LH-RH in various structures of the rat hypothalamus. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 8: 81-92.
- 16.-Selmanoff M.K., Wise P.M. and Barraclough C.A. (1980). Regional distribution of Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the rat brain determined by microdissections and radioimmunoassay. *Brain Res.* 192: 421-432.
- 17.-Martin J.B., Reichlin S. and Brown G.M. (1977) *Clinical Neuroendocrinology*. F.A. Davies Co. Philadelphia U.S.A. 13-44.

- 18.- Lee J.N., Sepala M. and Chard T. (1981) Characterization of placental luteinizing hormone-releasing factor like material. *Acta Endocrinol.* 96: 394-397.
- 19.- Clayton R.N., Harwood J.P. and Catt K.J. (1979) Gonadotropin releasing hormone binds to luteal cells and inhibits progesterone production. *Nature* 282: 90-92.
- 20.- Sharpe R.M. and Fraser H.M. (1980) HCG stimulation of testicular LHRH activity. *Nature* 287: 642-643.
- 21.- Rotsztejn W.H., Charli J.L., Patton E., Epelbaum J. and Kordon C. (1976) In vitro release of LHRH from rat mediobasal hypothalamus. Effect of potassium, calcium and dopamine. *Endocrinology* 99: 1663-1666.
- 22.- Scheider H.P.G. and McCann S.M. (1969) Possible role of dopamine as a transmitter to promote discharge of LH-releasing factor. *Endocrinology* 85: 121-136.
- 23.- Gallardo E. and Ramirez V.D. (1977) A method for superfusion of rat hypothalami. Secretion of luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 155: 79-82.
- 24.- Goddard E.A., Millar R.P. and Berman M.C. (1981) Factors affecting luteinizing hormone releasing hormone and somatostatin release from rat hypothalami in vitro. In: *Neuropeptides: Biochemical and Physiological studies*. R.P. Millar ed.
- 25.- Kao L.W.L. and Weis J. (1977) Release of Gn-RH from isolated perfused medial basal hypothalamus by melatonin. *Endocrinology* 100: 1723-1727.
- 26.- Negro Vilar A., Ojeda S.R., McCann S.M. (1979) Catecholaminergic modulation of luteinizing hormone-releasing hormone release by median eminence terminals in vitro. *Life Sci.* 23: 1493-1495.
- 27.- McEwen B.S. The brain as a target organ of endocrine hormones. (1980) In: *Neuroendocrinology*. D.T. Krieger and J.C. Hughes eds. Massachusetts 33-44.

- 28.- Shivers B.D., Harlan R.E., Morell J.I. and Pfaff D.W. (1983) --
Immunochemical location of luteinizing hormone releasing hormone in
male and female rat brains: Quantitative studies on the effect of
gonadal steroids. *Neuroendocrinology* 36: 1-12.
- 29.- King J.A. and Millar R.P. (1980) Comparative aspects of luteinizing
hormone-releasing hormone structure and function in vertebrate phylo
geny. *Endocrinology* 106: 707-717.
- 30.- Adams T.E. and Nett T.M. (1979) Interaction of Gn-RH with anterior -
pituitary. Role of divalent cations, microtubules and microfilaments
in the GnRH activated gonadotrop. *Biol. Reprod.* 21: 1076-1080.
- 31.- Boyer R.M. (1978) Control of the onset of puberty. *Ann Rev. Med.* 29:
509-520.
- 32.- Grumbach M.M. The neuroendocrinology of puberty. In: *Neuroendocrino-
logy*. D.T. Krieger and J.C. Hughes eds. Massachusetts 249-258.
- 33.- Yen S.S.C. (1980) Neuroendocrine regulation of the menstrual cycle.
In: *Neuroendocrinology*. D.T. Krieger and J.C. Hughes eds. Massachu-
setts . 270-285.
- 34.- Moss R. and McCann S.M. (1973) Induction of mating behavior in rats
by LHRF. *Science* 181: 177-179.
- 35.- Pfaff D.W. (1973). Luteinizing hormone releasing factor potentiates
lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats.
Science 182: 1148-1149.
- 36.- Sakuma Y. and Pfaff D.W. (1980) LHRH in the mesencephalic central
gray can potentiate lordosis reflex in female rats. *Nature* 283: 566-
567.
- 37.- Renaud L.P., Martin J.B. and Brezeau P. (1975) Depressant action of
TRH, LHRH and Somatostatin on activity of central neurons. *Nature* 255:
233-235.

- 38.- Kastin A.J., Miller L.H., Sandman C.A., Schally A.V. and Plotnikoff N. P. (1977) CNS and pituitary effects of hypothalamic peptides and MSH. In: *Youdin M.B.H. Essays in Neurochemistry and Neuropharmacology 1*, London. 139-176.
- 39.- Mitnick M. and Reichlin S. (1972) Enzymatic Synthesis of Thyrotropin releasing hormone. *Endocrinology*. 91: 1145-1153.
- 40.- Millar R.P., Wegener I. and Schally A.V. (1981) Putative prohormonal luteinizing hormone-releasing hormone (12). In: *Neuropeptides. Biochemical and Physiological studies*. Ed. R.P. Millar. Churchill Livingstone Edinburg.
- 41.- Gautron J.P., Pattou E. and Kordon C. (1981) Occurrence of higher molecular forms of LHRH in fractionated extracts of rat hypothalamus, cortex and placenta. *Mol. Cell. Endocrinol.* 24: 1-15.
- 42.- Curtis A. and Fink G. (1983) A higher molecular weight precursor of luteinizing hormone-releasing hormone from rat hypothalamus. *Endocrinology* 112: 390-393.
- 43.- Sachs H., Goodman R., Osinchak J. and McKelvy J. (1971) Supraoptic neurosecretory neurons of the guinea pig in organ culture. Biosynthesis of vasopresin and neurophysin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2782-2786.
- 44.- Pearson D., Shainberg A., Malamed S. and Sachs H. (1976) The hypothalamic neurohypophyseal complex in organ culture: Effects of metabolic inhibitors, biologic and pharmacologic agents. *Endocrinology* 96: 994-1003.
- 45.- Gainer H., Sarne Y. and Brownstein M. (1977) Neurophysin biosynthesis. Conversion of a putative precursor during axonal transport. *Science* 195: 899-900.
- 46.- Lin C., Joseph-Bravo P., Sherman T. Chan L. and McKelvy J.F. (1979) Cell-free synthesis of putative neurophysin precursors from rat and mouse hypothalamic poly(A)-RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 89: 943-950.

- 47.- Liotta P., Gildersleeve D., Browenstein M. and Krieger D.T. (1979) Evidence of brain synthesis of immunoreactive ACTH and β -endorphin like activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 1448-1452.
- 48.- Hirata Y., Yamamoto H., Matsukura M. and Imura H. (1975) In vitro release and biosynthesis of tumor ACTH and ectopic ACTH producing tumors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 41: 106-114.
- 49.- Nakanishi S., Inoue A., Kita T., Nakamura M., Chang A.C.Y., Cohen S. N. and Numa S. (1979) Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin β -lipotropin precursor. Nature 278: 423-427.
- 50.- Loh Y.P. and Chang T.L. (1982) Pro-opiocortin converting activity in rat intermediate and neural lobe secretory granules. FEBS letters 137: 57-62.
- 51.- Meister A. and Tate S. (1976) Glutathione and related gammaglutamyl compounds; biosynthesis and utilization. Ann. Rev. Biochem. 45: 559-599.
- 52.- Kurahashi K. (1974) Biosynthesis of small peptides. Ann. rev. Biochem. 43: 445-459.
- 53.- Gullemin R. (1971) In vitro synthesis of Thyrotropin releasing factor. Program. First Meet. Neurosci. Soc. pp70.
- 54.- McKelvy J.F. (1974) Biochemical neuroendocrinology. I Biosynthesis of Thyrotropin releasing hormone (TRH) by organ cultures of mamalian hypo thalamus Brain Res. 65: 489-502.
- 55.- Grim-Jorgensen Y., and McKelvy J.F. (1976) TRF biosynthesis in vitro. Effect of inhibitors of protein synthesis. Brain res. Bull. 1: 171-175.
- 56.- Richter K., Kawashima E., Egger R., Kreil G., Biosynthesis of Thyrotropin releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis*: partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. The EMBO journal 3: 617-621. (1984).

- 57.- Lauber M., Camier M., Cohen P. (1979) Immunological and biochemical characterization of distinct high molecular weight forms of neurophysin and somatostatin in mouse hypothalamic extracts. FEBS letters 97: 343-347.
- 58.- Goodman R.H., Jacobs J.W., Chin W.W., Lund P.K. and Habener J.F. (1980) Nucleotide sequence of a cloned structural gene coding for a precursor of pancreatic somatostatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5869-5873.
- 59.- Joseph-Bravo P., Charli J.L., Sherman T., Boyer H., Bolivar F. and McKelvy J.F. (1980) Identification of a putative hypothalamic mRNA coding for somatostatin and of its product in cell-free translation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 94: 1004-1012.
- 60.- Minth C.D., Taylor W.L., Magazin M. and Dixon J.E. (1982) The structure of clone DNA complementary to catfish pancreatic somatostatin-14 messenger RNA. The Journ. Biol. Chem. 257: 10372-10377.
- 61.- Goodman R.H., Lund P.K., Barnett F.H. and Habener J.F. (1981) Intestinal pre-prosomatostatin. The Journ. Biol. Chem. 256: 1499-1501.
- 62.- Rivier J., Spiess J., Thorner M. and Vale W. (1982) Nature 300: 276-278.
- 63.- Mayo K.E., Vale W., Rivier J., Rosenfeld M.G. and Evans R.M. (1983) Expression, cloning and sequence of a cDNA encoding human growth hormone releasing factor. Nature 306: 86-88.
- 64.- Deeley R.G., Gordon J.I., Burns A.T.H., Mulliux K.P., Stein M.B. and Goldberger R.F. (1977) Primary activation of the Vitellogenin gene in the rooster. Journ. Biol. Chem. 252: 8310-8319.
- 65.- Lizardi P. (1983) Methods for preparation of messenger RNA. Methods in Enzymology, Vol. 96. *Biomembranes*. Academic Press pp38-49.
- 66.- Leder A.H. (1972) Purification of biological active globin messenger

RNA by chromatography on oligothymidilic acid cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408.

- 67.- Metodología proveída por la casa comercial Bethesda Research Laboratories Inc., adjunta a la resina. (1983).
- 68.- Pelham R.B. and Jackson R.J. (1976) An efficient mRNA dependent translation system for reticulocyte lysates. Journ. Biochem. 67: 247-256.
- 69.- Erickson A.H., Blobel G. (1983) Cell-free translation of messenger RNA in wheat germ system. Methods in Enzymology, Vol. 96 *Biomembranes*. Academic Press. pp 38-49.
- 70.- Lin C., Joseph-Bravo P., Sherman T., Chan L., McKelvy J.F. (1979) Cell-free synthesis of a putative neurophysin precursor from rat and mouse hypothalamic poly(A)-RNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 89: 943-950.
- 71.- Laemmli V, Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 68 (1970).
- 72.- Díaz de León L., Breikereutz D., Paglia L., Stern R. (1981) Aislamiento y caracterización parcial de polisomas activos en tejidos calcificados y con matriz extracelular. Arch. Invest. Méd. (Méx.) 12: 275-296.
- 73.- Hames B.D. and Rickwood D. (1981) *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. IRL Press Limited, England.
- 74.- Jackson R.J. and Hunt T. (1983) Preparation and use of nuclease treated rabbit reticulocyte lysate for the translation of eukaryotic messenger RNA. Methods in Enzymology, Vol. 96 *Biomembranes*. Academic Press pp 50-73.
- 75.- Método optimizado por la Dra. M. Morrison del Health Science Center, Dallas Texas USA, según el método descrito por Roberts y Paterson (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2330-2334.

- 76.- Nett T.M., *et al.* (1973) A radioimmunoassay for gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 880-885.
- 77.- Arimura A., Sato H., Dupont A., Nishi N. and Schally A.V. (1975) *Science* 189: 1007-1009.
- 78.- Lingappa V., Katz F.N., Lodish H.E. and Blobel G. (1978) A signal sequence for the insertion of transmembrane glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 253: 8667-8670.
- 79.- Uhler M., Herbert E., D'Eustachio P. and Ruddle F.D. (1983) The mouse genome contains two nonallelic Pro-opiomelanocortin genes. *J. Biol. Chem.* 9444-9453.
- 80.- Dutlow C.M. and Millar R.P. (1981) Rat testis immunoreactive LHRH - differs structurally from hypothalamic LHRH. *Bochem. Biophys. Res. Commun.* 101: 486-494.
- 81.- Miyamoto K., Hasegawa Y., Nomura M. and Matsuo H. (1984) Identification of the second gonadotropin-releasing hormone in chicken hypothalamus: Evidence that gonadotropin secretion is probably controlled by two distinct gonadotropin releasing hormones in avian species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 3874-3878.
- 82.- Shibahara Y. *et al.* (1983) *The EMBO Journ.* 2: 775-779.
Resúmenes del Congreso Internacional de Endocrinología, Quebec, Canada Julio 1984. (Resumen # 966).
- 83.- Nawa H., Hirose T., Takashima H., Inayama S. and Nakanishi S. (1983) Nucleotide sequence of cloned cDNAs for two types of bovine brain substance P precursor. *Nature* 306: 32-36.