



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

03062
29/18

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Unidad Académica de los Ciclos Profesional
y de Posgrado del Colegio de Ciencias y
Humanidades

REGULACION DE LA EXPRESION DEL GENE DE TRH EN EL
HIPOTALAMO DE LA RATA

T E S I S

Que para obtener el Titulo de
MAESTRA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

p r e s e n t a

ROSA MARIA URIBE VILLEGAS

Centro de Investigación Sobre Ingeniería
Genética y Biotecnología

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

REGULACION DE LA EXPRESION DEL GENE DE TRH EN EL
HIPOTALAMO DE LA RATA.

T E S I S

que para obtener el titulo de maestro en
investigación biomédica básica

presenta la

Q.F.B. Rosa María Uribe Villegas

1988

Este trabajo fué realizado en el Centro de
Investigación Sobre Ingeniería Genética y
Biotecnología, U.N.A.M., bajo la dirección del
Dr. Jean Louis Charli, con el financiamiento del
CONACYT.

INDICE

Abreviaturas	1
I. INTRODUCCION	2
I.1 Generalidades sobre Comunicación Inter celular	2
I.2 Un sistema de Control Homeostático en Organismos Superiores	12
I.4 La Hormona Liberadora de Tirotrópina	19
I.5 Relevancia Fisiológica del TRH en el control Endócrino de un Organismo	21
II OBJETIVOS	30
III MATERIALES Y METODOS	32
IV RESULTADOS	36
V DISCUSION	47
REFERENCIAS	56
ANEXO I	66

Abreviaturas

ACTH	Hormona Corticotrópica
ADN	Ac. Deoxiribonucleico
AMPc	Monofosfato ciclico de Adenosina
ARNm	Ac. ribonucleico mensajero
CRF	Hormona Liberadora de la Hormona Corticotrópica
DA	Dopamina
GABA	Ac. Aminobutirico
GTP	Trifosfato de Guanosina
InsP	Trifosfato de Inositol
LA	Lóbulo Anterior
LI	Lóbulo Intermedio
MSH	Hormona Estimulante de los Melanocitos
NA	Noradrenalina
PE	Prolin-endopeptidasa
PGAI	Piroglutamato amino peptidasa I (soluble)
PGAII	Piroglutamato amino peptidasa II (membranal)
POMC	Proopiomelanocorticotropina
SNC	Sistema Nervioso Central
SRIF	Hormona inhibidora de la liberacion de la hormona de crecimiento (Somatostatina)
T_3	Triiodotironina
T_4	Tiroxina
TRH	Hormona liberadora de la hormona tirotrópica
TSH	Hormona Tirotrópica

I. INTRODUCCION

I.1. Generalidades Sobre Comunicación Intercelular.

Los organismos multicelulares están constituidos por poblaciones de células especializadas, que realizan las funciones fisiológicas y bioquímicas del organismo. Estos grupos celulares u órganos, trabajan de manera coordinada utilizando mecanismos eficientes de comunicación intercelular.

La comunicación celular puede realizarse por contactos directos, donde las células solo interactúan con las células vecinas (uniones comunicantes por ejemplo), o bien mediante moléculas señal, liberadas al espacio extracelular (1). Estas moléculas presentan características químicas diferentes: pueden ser hidrosolubles como las proteínas, aminoácidos y algunos derivados de éstos ó liposolubles como las hormonas esteroideas y tiroideas (2).

La comunicación mediada por sustancias químicas se ha clasificado en tres tipos (3), tomando como base la distancia que recorre la molécula señal desde que es liberada por una célula, hasta que alcanza a la célula blanco. a).- La comunicación autocrina, en la cual, las moléculas señal autorregulan a la célula que las produce. b).- La comunicación parácrina, esta se realiza a distancias cortas entre células vecinas, como es el caso de la comunicación nerviosa donde una neurona libera al espacio sináptico sus neurotransmisores que migran algunos micrómetros para alcanzar la membrana postsináptica de la célula blanco; o bien, se realiza entre células no contiguas, donde las moléculas viajan por el espacio extracelular hasta llegar a células blanco que se encuentran en el mismo órgano (páncreas por ejemplo). c).- En la comunicación endócrina o comunicación a gran distancia las células vierten sus moléculas al sistema circulatorio y por este medio

son transportadas a numerosas células del organismo. Este tipo de comunicación es de gran importancia en los organismos superiores pues permite además generar mecanismos de retroalimentación de los órganos blanco hacia los órganos efectores (Fig. 1).

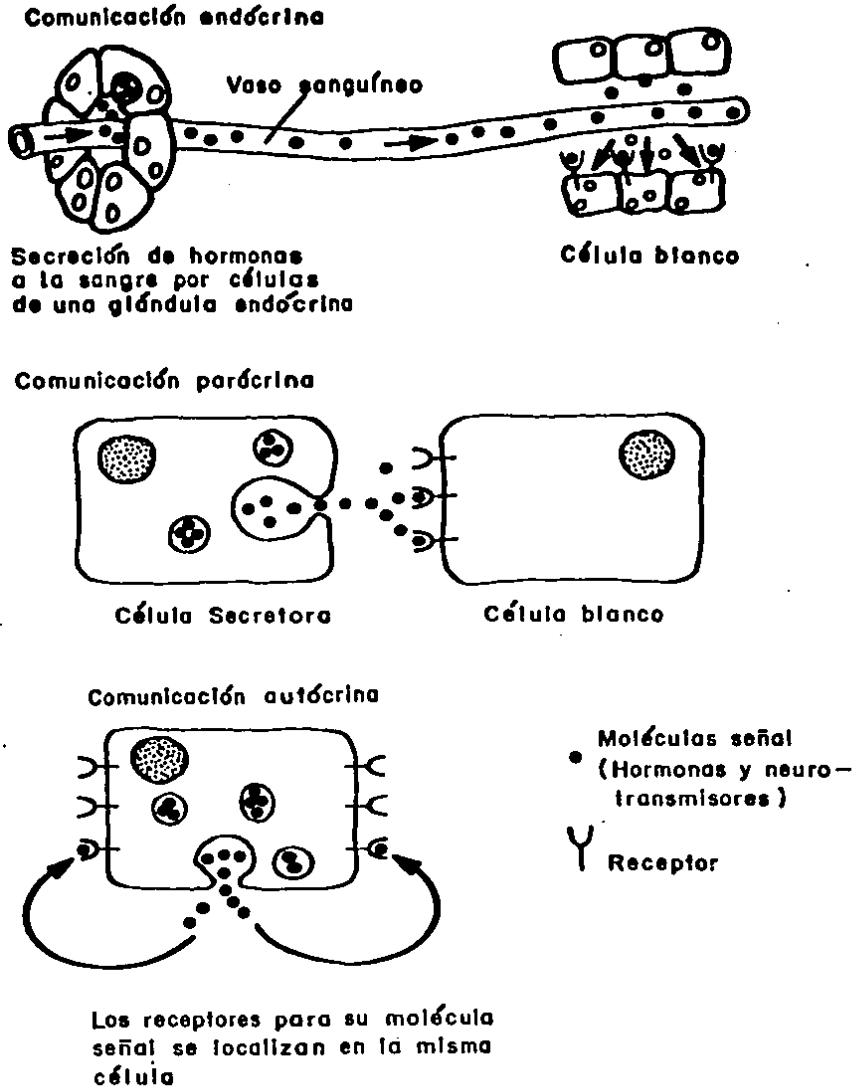


Fig 1 Representación esquemática de los diferentes tipos de comunicación celular mediada por sustancias químicas

Las moléculas señal o ligandos, al interactuar con sus receptores en una célula dada, inducen respuestas celulares que son de diferentes tipos (cambios en el metabolismo de la célula, flujos iónicos, etc.). La capacidad de una célula para responder a una determinada señal radica en los receptores. Los receptores presentan alta especificidad para cada una de las moléculas señal, son todos de naturaleza protéica y pueden estar embebidos en las membranas plásmicas o encontrarse al interior de la célula en el citoplasma o núcleo (Fig. 2a). Los receptores membranales interactúan con las moléculas hidrosolubles y los receptores citosólicos o nucleares con las moléculas liposolubles que atraviesan la membrana citoplásmica.

Los receptores citoplásmicos al unirse con su hormona específica forman un complejo hormona-receptor en el interior de la célula, el cual es responsable de inducir respuestas a largo plazo que involucran cambios en la transcripción de los genes. Los receptores membranales en su mayoría están acoplados a proteínas regulatorias (proteínas G) y proteínas con actividad catalítica tales como la adenilato ciclasa (Fig. 2a) y la fosfolipasa C, que modifican su actividad en respuesta a la unión hormona-receptor siendo estas las responsables de producir moléculas que funcionan como segundos mensajeros o transductores de la información extracelular al interior de la célula (4). En el caso de estas proteínas los segundos mensajeros son el AMPc y los derivados del fosfatidil inositol 4-5 bifosfato (1,4,5 inositol trifosfato y diacilglicerol) que participan entre otros procesos en la regulación de canales iónicos, actividades enzimáticas, síntesis y liberación de moléculas, etc., (Fig. 2b).

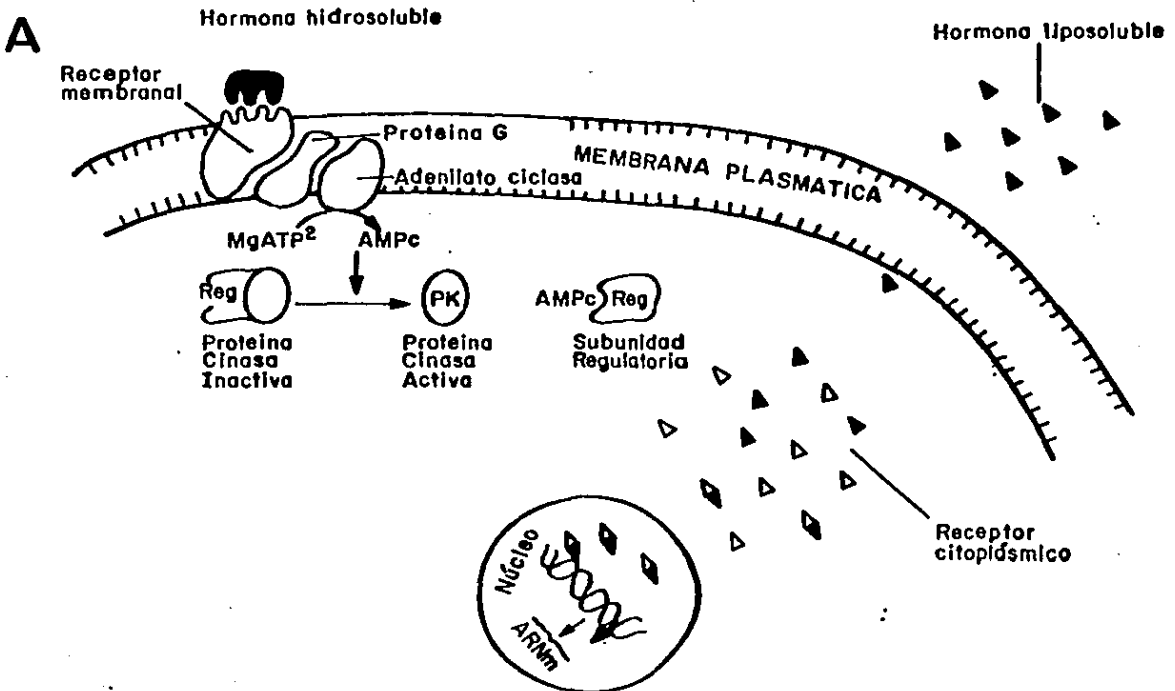
La respuesta celular a una señal dada puede ser de velocidad y duración variable. Hay respuestas rápidas como son los cambios en la

FIGURA 2.

Sistemas de transducción de señales extracelulares.

A) Representación gráfica de receptores membranales y citoplásmicos.

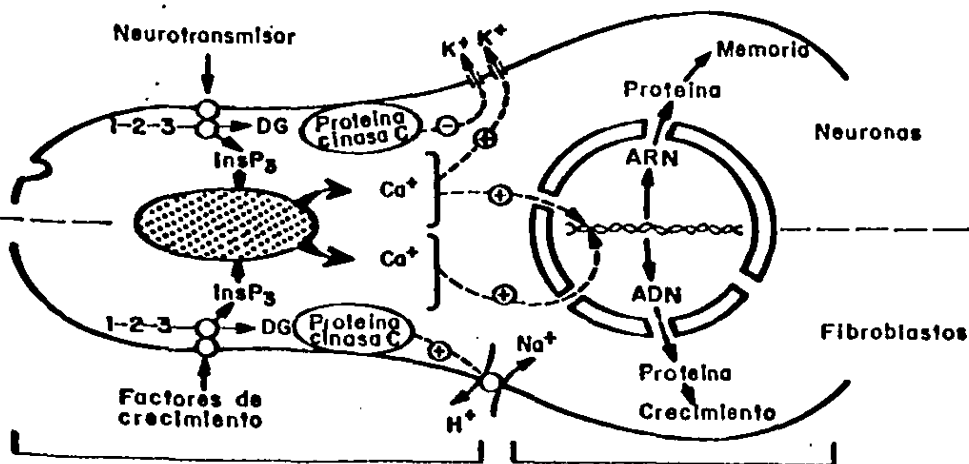
El receptor membranar que se presenta, es un receptor de la familia de los que se encuentran acoplados a una proteína G (regulatoria) y a un sistema de segundos mensajeros (por ejemplo AMPc). El receptor citoplásmico para inducir una respuesta requiere unirse a su ligando en el interior de la célula, para formar un complejo hormona-receptor y como tal interaccionar con los ac. nucléicos de la célula.



B) Participación de los segundos mensajeros en la transmisión de señales

La interacción de moléculas señal con receptores de membrana plasmática induce la generación de los segundos mensajeros (AMPC, trifosfato de inositol, Ca^{++} , diacil glicerol) que modifican la actividad celular induciendo respuestas rápidas (liberación de sustancias químicas, apertura de canales iónicos) y/o respuestas lentas (síntesis de proteínas). En muchos casos un mismo segundo mensajero puede ser generado por diferentes receptores específicos dependiendo de la célula en cuestión. En el ejemplo que se ilustra, el sistema de trifosfato de inositol puede ser activado en la neurona por un neurotransmisor, modificando las corrientes iónicas en la membrana plasmática o induciendo síntesis de proteínas. Por otro lado este mismo sistema es activado en fibroblastos por factores de crecimiento, provocando cambios similares a los de la neurona. Sin embargo los efectos inducidos en los dos tipos celulares conllevan a fines diferentes.

B



permeabilidad de la membrana plasmática (5) que se generan por la interacción ligando receptor que induce la modulación, apertura o cierre de los canales que rodean al receptor; en algunos casos el receptor mismo funciona como canal iónico como el receptor de GABA (6). Otros tipos de respuesta rápida son la alteración de la actividad de enzimas intracelulares, por ejempl., la activación de las proteínas cinasas que al fosforilar a otras proteínas ó a sí mismas promuevan su inactivación o activación (7). Las respuestas lentas involucran generalmente cambios en la expresión genética; anteriormente se creía que solo las hormonas liposolubles eran responsables de esta actividad, pero en la actualidad se ha determinado que también las hormonas hidrosolubles tienen esta capacidad (8). Así mismo, se han detectado respuestas rápidas (que no involucran efecto sobre síntesis de proteínas) para hormonas liposolubles.

En el caso de células secretoras de péptidos y proteínas, la regulación de la síntesis protéica es de particular relevancia en la producción de estas moléculas señal. En general la biosíntesis de proteínas puede dividirse en cinco etapas básicas: transcripción del ADN (síntesis de ARNm); modificaciones postranscripcionales del ARNm (metilaciones, eliminación de secuencias intrónicas, adición de colas de adenina y adición decap); transporte de núcleo a citoplasma; traducción y modificaciones postraduccionales (Fig. 3). Las señales extracelulares regulan varias de las etapas biosintéticas de un péptido o proteína dentro de la célula; sin embargo en la actualidad existen más evidencias de regulación a nivel de la transcripción (9).

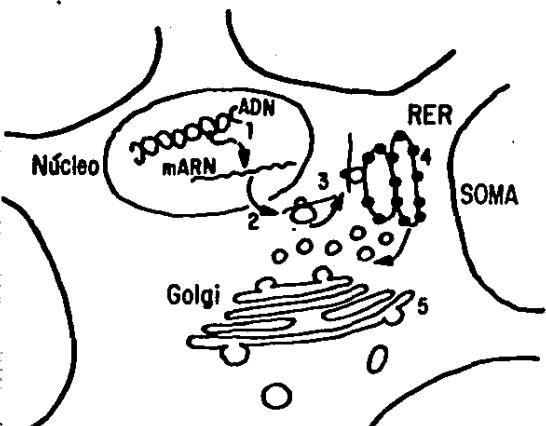
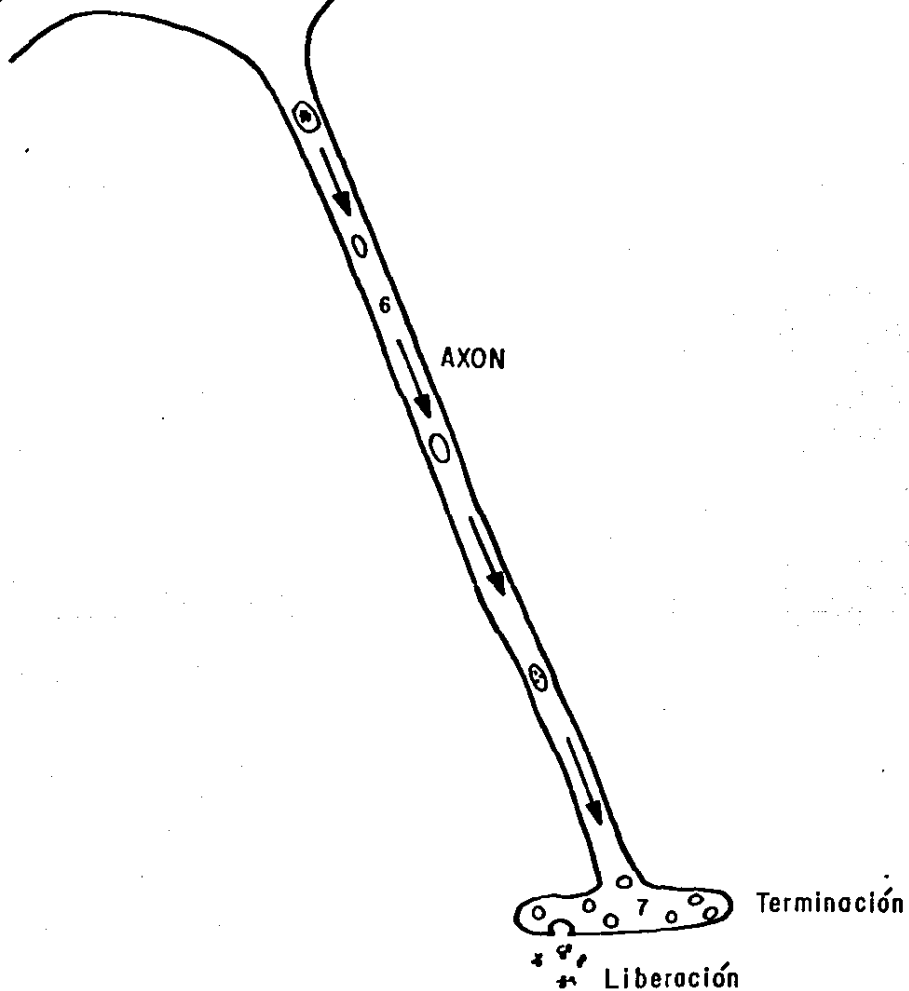


FIGURA 3

- 1.- Transcripción y Procesamiento del ARNm
- 2.- Transporte del ARNm del Núcleo al Citoplasma
- 3.- Traducción
- 4.- Procesamiento del Pre-propéptido en el Retículo endoplásmico rugoso
- 5.- Modificaciones postraduccionales e Inicio del procesamiento del propeptido en aparato de Golgi
- 6.- Transporte y Procesamiento del propeptido
- 7.- Almacenamiento del péptido activo



La transcripción corresponde al copiado de un gene específico por la ARN polimerasa II para sintetizar un ARN heteronuclear; para que este evento pueda llevarse a cabo, es necesario que el gene específico se encuentre accesible a la polimerasa. Esta disponibilidad es adquirida durante los procesos de diferenciación que sufren las células en organismos multicelulares. Generalmente los genes activos presentan algunas características comunes como son estructura de cromatina menos densa, sitios hipersensibles a nucleasas y regiones poco metiladas (10). Dentro de estos genes activos, se encuentran los que se expresan constitutivamente y aquellos en los que su expresión esta regulada por efectores intra o extracelulares. Ha sido difícil determinar como se regula la expresión de proteínas no constitutivas, sin embargo ahora se conocen algunos elementos que participan en la activación o inactivación de los genes de estas proteínas (10). En los genes se han identificado secuencias que participan en la regulación de su expresión: la región promotora, que se localiza aproximadamente 100 pb arriba del sitio de iniciación de la transcripción, es indispensable para un inicio preciso y eficiente de la transcripción, y es el anclaje para la RNA polimerasa II; las regiones reguladoras son responsables de controlar el número de moléculas de ARNm sintetizadas por la ARN polimerasa II. Estas regiones son secuencias discretas (12-15 pb) dentro del gene, no tienen una localización específica, es decir que puede encontrarse antes o después del gene estructural, o dentro de éste. En las regiones regulatorias existen unas llamadas amplificadoras o "enhancers" que pueden actuar sobre promotores de otros genes que se encuentran a grandes distancias y de manera independiente de la orientación en que se encuentren con relación al promotor más cercano. La región promotora y la región reguladora no

de la Proopiomelanocorticotropina (POMC) han aportado información sobre los eventos que ocurren en la interacción de los órganos involucrados en el control neuroendócrino. El precursor de la POMC, contiene en su estructura (Fig. 5) la secuencia para la hormona corticotrópica (ACTH), la β lipotrópina, la β endorfina y hormona estimuladora de los melanocitos (α MSH); se encuentra presente en el lóbulo anterior (LA) e intermedio (LI) de la hipófisis de la rata. Sin embargo, su procesamiento a las diferentes hormonas varía: en el lóbulo anterior se produce ACTH y β endorfina mientras que en el lóbulo intermedio se procesa hasta MSH (18).

El control de la liberación de los productos de la POMC así como la expresión del gen, esta regulada por factores diferentes en ambos lóbulos: en el lóbulo anterior de la adenohipófisis la hormona liberadora de la Corticotropina (CRF), estimula la liberación de la ACTH y además es capaz de incrementar los niveles de ARNm de POMC (19). La unión de la CRF a su receptor activa la adenilato ciclasa que incrementa los niveles citoplásmicos de AMPc y esto activa proteínas cinasas dependientes de AMPc, que han sido involucradas en los mecanismos de liberación por medio de apertura de canales de calcio. En cultivos de líneas celulares hipofisiarias que producen ACTH, los derivados del AMPc (8-bromo-AMPc) y de los esteres de forbol (PDBu) incrementan los niveles de ARNm de la POMC (20). Sugiriendo, que el efecto de la CRF sobre la expresión del gen puede estar mediado por activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc o la por proteína cinasa C. La transcripción del gen de POMC en este lóbulo se ve afectada también por los glucocorticoides suprarrenales, los cuales ejercen efectos de retroalimentación negativa sobre los corticotropos. Así, en ratas adrenalectomizadas los niveles del ARNm de la POMC se

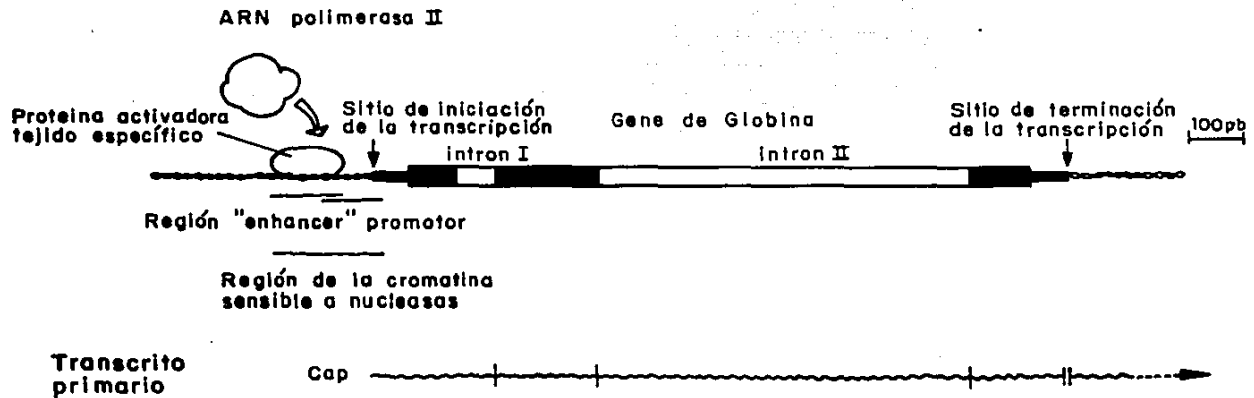


Fig 4 Factores que intervienen en la expresión de un gene. Los genes de células eucariotes están constituidos por regiones regulatorias (promotores y regiones "enhancer") intrones y exones. La ARN polimerasa II se une al promotor para transcribir el gene y producir un ARN primario, que posteriormente es procesado antes de salir de el núcleo. En el extremo 5' de los genes se localizan las regiones regulatorias que regulan la expresión genética mediante la interacción con factores protéicos solubles que se encuentran en la célula.

I.2.Un Sistema de Control Homeostático en Organismos Superiores.

El sistema hipotálamo-hipófisis-órgano blanco, es un modelo complejo donde se puede apreciar la coordinación en la comunicación de tres tipos de sistemas celulares diferentes, y la forma en que son modificadas tanto la transcripción de genes específicos como la liberación de sus señales hormonales. En este sistema, las neuronas del hipotálamo reciben información del sistema nervioso que induce inhibición o activación de la liberación de neurotransmisores clásicos y/o péptidos al sistema portal (13). Del sistema portal los péptidos hipotalámicos son transportados hasta la adenohipófisis en donde regulan la liberación de las hormonas hipofisarias (14). Las hormonas hipofisarias a su vez regulan la liberación de las hormonas de los órganos blanco (tiroides, ovarios, glándula adrenal, etc.). Las hormonas de los órganos blanco interactúan con las células de la hipófisis e hipotálamo ejerciendo efectos de retroalimentación sobre dichas células, manteniendo o regulando la homeostásis del organismo.

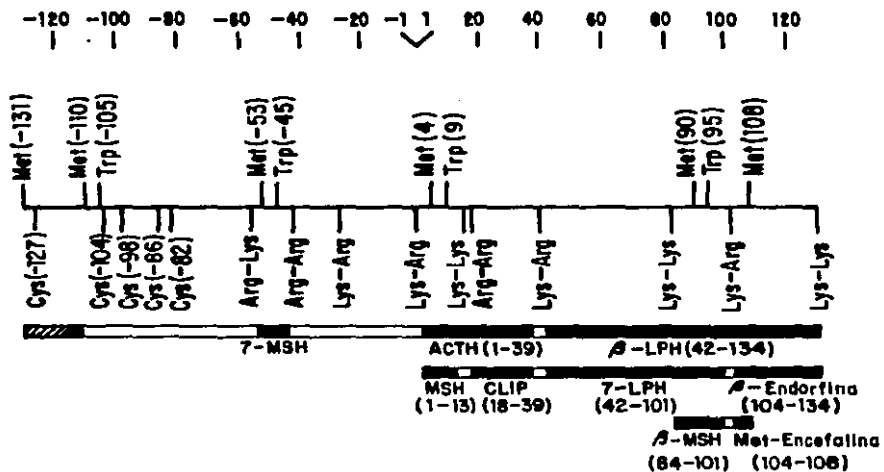
Con el desarrollo de técnicas de biología molecular se han determinado las señales que afectan la transcripción de genes específicos involucrados en el funcionamiento de los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano blanco. Debido a la accesibilidad metodológica se tienen más evidencias sobre los efectores que modifican la transcripción de los péptidos de la hipófisis (prolactina, tirotropina, hormona de crecimiento, corticotropina, etc. (15,16,17), ya que estos péptidos se encuentran en mayor concentración que los péptidos del hipotálamo.

I.3.Efectores que Regulan la Biosíntesis de Hormonas Protéicas.

Los estudios sobre la regulación de la biosíntesis del precursor

de la Proopiomelanocorticotropina (POMC) han aportado información sobre los eventos que ocurren en la interacción de los órganos involucrados en el control neuroendócrino. El precursor de la POMC, contiene en su estructura (Fig. 5) la secuencia para la hormona corticotrópica (ACTH), la β lipotrópina, la β endorfina y hormona estimuladora de los melanocitos (α MSH); se encuentra presente en el lóbulo anterior (LA) e intermedio (LI) de la hipófisis de la rata. Sin embargo, su procesamiento a las diferentes hormonas varía: en el lóbulo anterior se produce ACTH y β endorfina mientras que en el lóbulo intermedio se procesa hasta α MSH (18).

El control de la liberación de los productos de la POMC así como la expresión del gene, esta regulada por factores diferentes en ambos lóbulos: en el lóbulo anterior de la adenohipófisis la hormona liberadora de la Corticotropina (CRF), estimula la liberación de la ACTH y además es capaz de incrementar los niveles de ARNm de POMC (19). La unión de la CRF a su receptor activa la adenilato ciclasa que incrementa los niveles citoplásmicos de AMPc y esto activa proteínas cinasas dependientes de AMPc, que han sido involucradas en los mecanismos de liberación por medio de apertura de canales de calcio. En cultivos de líneas celulares hipofisiarias que producen ACTH, los derivados del AMPc (8-bromo-AMPc) y de los ésteres de forbol (PDBu) incrementan los niveles de ARNm de la POMC (20). Sugiriendo que el efecto de la CRF sobre la expresión del gene puede estar mediado por activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc o la por proteína cinasa C. La transcripción del gene de POMC en este lóbulo se ve afectada también por los glucocorticoides suprarrenales, los cuales ejercen efectos de retroalimentación negativa sobre los corticotropos. Así, en ratas adrenalectomizadas los niveles del ARNm de la POMC se



- | Señales de procesamiento por proteasas Lys-Lys y/o Arg-Arg
- ▬ Secuencias de péptidos con actividad biológica
- ▬ Secuencias de péptidos que no tienen actividad fisiológica conocida
- ▨ Secuencia del péptido señal

Fig 5 Estructura del precursor de Proopiomelanocortina

incrementan hasta cinco veces, mientras que la restitución de los niveles normales de glucocorticoides revierte el efecto (21). El mecanismo de acción propuesto para este efecto de los glucocorticoides, es la interacción directa del complejo hormona-receptor con secuencias específicas en el ADN. Los trabajos donde se empleó transfección y expresión del gene de la POMC en células cultivadas, han revelado que secuencias en el extremo 5' del gene de POMC (-670 a -38) son responsables del control negativo de la transcripción del gene de la POMC por los glucocorticoides. Además se ha determinado dentro de esta región una secuencia (5' CCTCCGC3') que es homóloga a otra secuencia localizada en el extremo 5' del gene de la metalotionina IIA, para la cual previamente se ha demostrado que interactúa con el receptor de glucocorticoides (22).

En el lóbulo intermedio de la hipófisis, es la dopamina (DA) la que está involucrada en la regulación de la liberación de la MSH y la biosíntesis del POMC (23). La estimulación de receptores D2 de dopamina en la hipófisis intermedia disminuye los niveles de ARNm de la POMC. Tratamiento de células adenohipofisiarias con toxina de Bordetella pertussis que induce la actividad de la adenilato ciclasa causa un efecto contrario al de la DA sobre los niveles de ARNm de la POMC; la exposición a foscolina (activador de la adenilato ciclasa) ó a 8-bromo-AMPC, induce un aumento en los niveles del ARN mensajero de la POMC y la inhibición de los efectos de la DA (24). Los receptores D2 están acoplados en el LI a una proteína inhibitoria dependiente de GTP, y al interaccionar la DA con sus receptores D2 se activa la subunidad catalítica que une al GTP e inhibe la adenilato ciclasa, disminuyéndose así los niveles de AMPC intracelular (25). Estos eventos desencadenan

entonces procesos intracelulares todavía no conocidos que inducen la inhibición de la transcripción del gene la POMC.

Como se puede observar la transcripción de un mismo precursor esta regulada por factores diferentes dependiendo del tipo celular en que se exprese. La transcripción de la POMC se ve afectada de manera diferente en la hipófisis: en el LA por la CRF y los glucocorticoides, y en el LI por la DA, que son también los efectores involucrados en su liberación. La respuesta diferencial de las células esta basada en el tipo de receptores que posean: se ha reportado que en el LI no existen receptores funcionales para los glucocorticoides (26).

El precursor de la POMC además es un ejemplo de procesamiento diferencial postraduccionel, ya que del mismo precursor, se obtienen varios péptidos con actividad fisiológica diferente, dependiendo del tipo celular que lo procese (debido probablemente a que las células poseen diferentes enzimas procesadoras).

Así como la biosíntesis de la POMC adenohipofisiaria es retrorregulada por la hormona liberada de su órgano blanco (glucocorticoides), existen además otros ejemplos de péptidos adenohipofisiarios donde se observa este evento. Los estrógenos (27) incrementan los niveles del ARN de prolactina (PRL) en la adenohipófisis. Al igual que para los glucocorticoides se ha identificado una secuencia dentro de la región 5' del gene de la PRL donde se une con el complejo estrógeno-receptor (28). Se ha observado además que el incremento en la transcripción del gene de la PRL mediado por factores proteicos puede ser potenciado por inhibidores de la metilación del ADN (29).

Para la hormona de crecimiento (GH) las hormonas tiroideas incrementan los niveles de su ARNm en la adenohipófisis (30) y en el

gene de la GH se han identificado dos regiones que responden a T3. Existe una secuencia que activa la transcripción (5'ARGGACGTGACCGCA3') localizada en el sitio (-179 a -167), y una región localizada entre -145 a -45 que se sugiere puede funcionar como región inhibitoria de la transcripción (31).

El análisis del efecto de las hormonas liposolubles sobre la transcripción, sugiere un mecanismo general en el cual los complejos hormona-receptor interactúan con regiones amplificadoras en el ADN. En el caso de los glucocorticoides se ha determinado una región consenso (5'GGGTACANNNTGTTCT3') de 16 pb que funciona como región reguladora en varios genes que son sensibles a regulación por esta hormona (32).

Como se mencionó anteriormente, las hormonas de los órganos blanco de la adenohipófisis ejercen efectos de retroalimentación a nivel de la biosíntesis de péptidos involucrados en el sistema neuroendócrino. En párrafos anteriores se ha revisado el cambio que inducen dichas hormonas a nivel de la transcripción de los genes de las hormonas hipofisiarias. La existencia de este control sobre las neuronas del hipotálamo había sido propuesto desde hace tiempo; sin embargo la sensibilidad de las técnicas empleadas no permitían determinar los efectos de las hormonas liposolubles sobre la transcripción de los genes de neuropéptidos (del hipotálamo) o de las enzimas responsables de la síntesis de neurotransmisores. Recientemente, sin embargo, se ha determinado que en ratas adrenalectomizadas los niveles de ARNm de la CRF hipotalámica disminuyen (21). Así al igual que con la ACTH, los glucocorticoides ejercen retroalimentación negativa a nivel hipotalámico sobre la transcripción. Otro ejemplo es la disminución en los niveles de ARNm de la POMC inducida por los estrógenos en el

hipotálamo de la rata (33). Existen también evidencias que apoyan la idea que hormonas del tipo de los glucocorticoides regulan los niveles de ARNm de las enzimas involucradas en la síntesis de catecolaminas, como es el caso de la tirosina hidroxilasa (34).

I.4. La Hormona Liberadora de Tirotropina.

En la búsqueda de las sustancias hipotalámicas responsables de controlar la liberación de las hormonas hipofisarias, el primer péptido aislado por los grupos de los Drs. Schally (35) y Guillemin (36) fué la hormona liberadora de tirotropina (TRH). El TRH es un tripéptido de estructura (pGlu-His-ProNH₂).

El TRH se encuentra en el hipotálamo de la mayoría de las especies (rata, ratón, humano, rana, pollo, cerdo, carnero, etc.). Técnicas de radioinmunoensayo e inmunocitoquímica permitieron identificar al TRH en otras regiones del cerebro extrahipotalámico (37), y localizar las terminales nerviosas que lo contienen. En el hipotálamo estas terminales se encuentran en: eminencia media, núcleo paraventricular, dorsomedial, supraquiasmático, región perifornical del hipotálamo basolateral; en el cerebro extrahipotalámico se localizan en lóbulos olfatorio, núcleo acumbens, tallo cerebral, medula espinal, y glándula pineal. También han permitido la identificación de TRH en otros órganos (aparato gastrointestinal, páncreas, placenta, próstata, piel) y fluidos extracelulares (sangre, orina, líquido amniótico, líquido cerebro espinal (38)).

La obtención y secuencia del ADNc del ARN mensajero para TRH del hipotálamo de la rata (39), proporcionó información sobre la estructura y peso molecular del precursor peptídico para TRH. El precursor contiene en su molécula, la secuencia de TRH repetida cinco veces y tiene un peso molecular de 23 000 daltones. Empleando técnicas de hibridización "in situ" se han localizado los somas celulares que sintetizan el precursor de TRH. En el hipotálamo los cuerpos se localizan en los núcleos paraventricular (zona parvocelular), preóptico supraquiasmático, dorsomedial, arcuato (porción posterior); y en el

cerebro extrahipotalámico en lóbulos olfatorios, núcleo comisural anterior, sustancia gris periaqueductal, raphe dorsal, raphe magnus, pallidus y obscuro, región peripiramidal y periolivar y núcleo reticularis del tálamo (40).

El estudio de la distribución del mensajero de TRH permitió identificar regiones del cerebro donde se localiza su ARNm y su precursor en las cuales no se había reportado la existencia de TRH detectado por inmunocitoquímica (lóbulo olfatorio, sustancia gris periaqueductal, y raphe dorsal).

Parte del TRH hipotalámico funciona como neurohormona al participar en el control del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, siendo responsable de la regulación de la liberación de TSH de los tirotrópos y de PRL de los lactotrópos. Como ya se mencionó, el TRH se encuentra ampliamente distribuido en el Sistema Nervioso Central (SNC) y debido a su amplia localización y a la existencia de receptores específicos en diferentes regiones ha sido propuesto como un posible neurotransmisor (41). Algunos de los efectos que se le atribuyen en su posible papel como neuromodulador son: aumentar el recambio de catecolaminas (42), liberación de dopamina de hipotálamo y núcleo acumbens (43), producir hipotermia en ratas (44), y afectar la actividad motora y varias pautas del comportamiento (45) estos estudios se han realizado principalmente en la rata.

Además cumple con otras características postuladas para un neurotransmisor: 1. Se encuentra localizado en terminales nerviosas de donde es liberado por altas concentraciones de K^+ de manera dependiente de la concentración de calcio extracelular. 2. Existen mecanismos de inactivación. Se han identificado actividades enzimáticas en diversos tejidos y fluidos fisiológicos capaces de

degradar al TRH. En particular, en el cerebro y el plasma se ha detectado una actividad de piroglutamato aminopeptidasa, que elimina el grupo piroglutamil del extremo amino terminal del péptido. Existen tres enzimas diferentes responsables de esta actividad. Una enzima membranal (Piroglutamato amino peptidasa II) (46), y otra enzima en el suero (Tiroliberinasa) (47). Ambas son metaloproteasas y presentan alta especificidad para el TRH. Otra enzima, soluble (Piroglutamato aminopeptidasa I), es una tior proteasa que corta cualquier enlace pGlu-X (48). Además, existe una endopeptidasa soluble que corta después de prolina (proilil-endopeptidasa) eliminando el grupo amido del TRH en el extremo carboxilo terminal para producir TRH ácido (49). Se piensa que la PGA II y la tiroliberinasa inactivan el TRH liberado en los fluidos biológicos (50). El papel de la PGA I y de la PE no se conoce todavía.

I.5.Relevancia Fisiológica del TRH en el Control Endócrino de un Organismo.

El TRH participa en la integración del Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, regulando la liberación de Tirotropina (TSH) de la adenohipófisis (51). La TSH libera a su vez a las hormonas tiroideas (T_3 y T_4) de la tiroides. El TRH responsable de la liberación de TSH es sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo (52), y es transportado a la eminencia media de donde posteriormente es liberado al sistema portal para llegar a la adenohipófisis, donde induce la liberación de TSH. Se ha estudiado, en algunas líneas celulares de hipófisis que producen TSH y PRL, el mecanismo responsable de la liberación de estas hormonas. En estas células, la interacción del TRH con sus receptores induce rápidamente la hidrólisis de fosfatidil inositol 4-5 bifosfato a 1,4,5 inositol trifosfato ($InsF_3$) y diacil

glicerol por la fosfolipasa C. Se produce también un incremento en la concentración de Ca^{++} en el citoplasma, que se puede deber a movilización de los iones Ca^{++} de compartimentos intracelulares promovido por el incremento de $InsP$ o por flujo de calcio extracelular (53). El diacilglicerol producido puede activar a la proteína cinasa C y ésta a su vez puede fosforilar proteínas que estén involucradas en la liberación. En una línea tumoral hipofisiaria el TRH es capaz de activar la fosforilación de proteínas via proteína-cinasas dependientes de calcio y proteína cinasa C. Es probable entonces, que la coordinación de estas dos vías genere la liberación de PRL y TSH en respuesta a TRH en estas líneas celulares.

La liberación de TSH esta regulada por otras sustancias además del TRH como son DA y Somatostatina (SRIF) que inhiben su liberación (54). Se ha determinado que en pacientes hipotiroideos la administración de L-dopa (precursor de la dopamina) o bromocriptina (agonista dopaminérgico) disminuye los niveles de TSH en sangre (55), y reduce la respuesta de la tirotropina al estímulo de TRH. El suministro de domperidona (antagonista dopaminérgico, que no cruza la barera hematoencefálica) induce un incremento de TSH en sangre (55). Aunado a este dato, la identificación de receptores para DA en la adenohipófisis y la disminución inducida por DA de manera dosis dependiente, de la liberación basal de TSH, así como de la estimulada por TRH, sugieren que existe un control inhibitorio directo sobre la adenohipófisis (55). La hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (SRIF) inhibe también la liberación de TSH in vitro (56), inmunización pasiva con anti-SRIF incrementa la liberación de TSH en sangre en respuesta a estres por frio o estimulación por TRH

(57). Existen otras moléculas que intervienen indirectamente en el control de la liberación de TSH como son: estrógenos, colécistoquinina, serotonina, y norepinefrina (Fig.6).

A pesar de que son varios los factores que intervienen en el control de la liberación de TSH, se ha estudiado más el efecto de TRH sobre el metabolismo de la tirotropina. Además de que el TRH causa liberación de TSH y PRL, el TRH incrementa la síntesis de las subunidades α y β que conforman a la TSH. Siguiendo la incorporación de aminoácidos marcados en las subunidades de la TSH, en ratas con el hipotálamo deaferentado, se encontró una disminución en los niveles de la TSH. Sin embargo, al medir la incorporación de aminoácidos en las subunidades separadas se encontró que el efecto es mayor en la subunidad β (58). Se ha tratado de medir los niveles de RNA en ratas deficientes en TRH pero los datos no han sido reproducibles (59). El TRH también tiene efecto sobre glicosilación de las subunidades; empleando la misma estrategia de deaferentar el hipotálamo en la rata se encontró disminución de la glicosilación (58); por otro lado lesiones del núcleo paraventricular inducen cambios en los patrones de glicosilación de la TSH que no ocurren en ratas con hipotiroidismo terciario (60). Además, en estudios de liberación in vitro de TSH en respuesta al TRH, se ha observado que el TRH induce la liberación preferencial de las formas glicosiladas de TSH (61).

El TRH también es capaz de disminuir el número de sus propios receptores en adenohipófisis en cultivo. Uno de los mecanismos propuestos para explicar esta observación; es la internalización del complejo hormona receptor (62), pero recientemente se ha observado que los niveles de ARNm para el receptor de TRH disminuyen en las células de la adenohipófisis expuestas al TRH (63). Sin embargo esto no

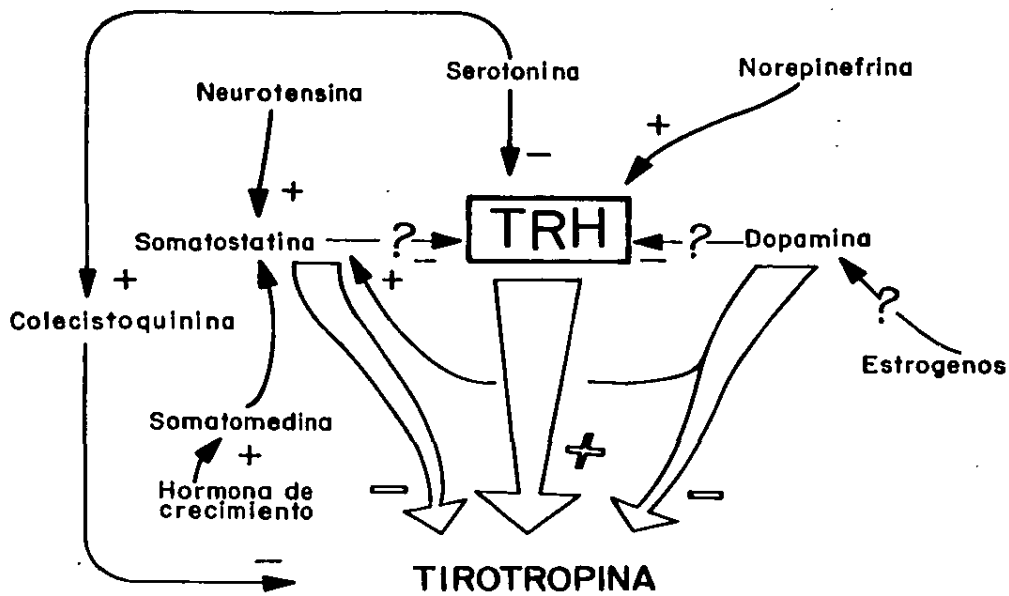


Fig 6 Neurotransmisores y péptidos que están involucrados en el metabolismo de la tirotrópina en los tirotrópos.

descarta que el TRH utilice ambos eventos para regular los niveles de sus receptores en la adenohipófisis.

A nivel de su célula blanco, además de incrementar la liberación de T_3 y T_4 , la TSH incrementa la síntesis y iodación de la Tiroglobulina (proteína precursora de las hormonas tiroideas) (64). El evento más rápido es la liberación de hormonas tiroideas, que genera un incremento de los niveles de estas en sangre, para ser distribuidas en todo el organismo e incrementar la síntesis o actividad enzimática de muchas proteínas de diferentes órganos. Este incremento genera mecanismos de retroalimentación negativa sobre los tirotrópos y probablemente sobre las neuronas del hipotálamo.

Se ha observado que las variaciones en los niveles de hormonas tiroideas modifican la tasa de transcripción de las subunidades de la TSH. En ratas hipotiroideas se ha observado un incremento notable en los niveles de los ARNm de las subunidades de la TSH, siendo mayor sobre la subunidad β (65). Si se restablecen los niveles de hormonas tiroideas a valores normales, los niveles del ARNm se normalizan. Se ha descrito también que en animales hipertiroideos la liberación de TSH disminuye. Este efecto puede deberse a tres factores: 1.- se ha determinado que en la adenohipófisis la actividad de la enzima membranal que degrada al TRH (PGA II) se incrementa en animales hipertiroideos (66), 2.- los receptores de TRH en la adenohipófisis disminuyen en cultivos de células hipofisiarias sometidas a altas concentraciones de T_3 (62), 3.- la síntesis de la TSH se ve disminuida por lo que hay menos hormona disponible para ser liberada.

Se ha postulado que los efectos de retroalimentación de las hormonas tiroideas no solo ocurren a nivel de la hipófisis, sino

también en el hipotálamo modificando el metabolismo del TRH en la neurona TRHérgica. El efecto de las hormonas tiroideas se ha estudiado midiendo variaciones en los niveles de TRH inmunoreactivo hipotalámico en respuesta a hipo e hipertiroidismo. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios. En Algunos estudios se ha encontrado incrementos en los niveles de TRH en respuesta a hipotiroidismo y disminución del mismo en hipertiroidismo (68), mientras que otros no han visto variación alguna (69). Más aún otros grupos han encontrado que los niveles de TRH inmunoreactivo se depletan en ratas tiroidectomizadas y que existe reversión a los niveles normales cuando se restituyen las hormonas tiroideas (70). Es posible que los efectos de las hormonas tiroideas no se reflejen en cambios reproducibles en los niveles de TRH porque estos son el resultado de los niveles de biosíntesis, degradación y liberación del TRH. También conviene considerar que probablemente solo una pequeña fracción del TRH hipotalámico es sometida a la retroalimentación.

Por otro lado en dos de los circuitos neuronales (noradrenérgico y dopaminérgico) que probablemente controlan las neuronas TRHérgicas hipofisiotróficas, se ha determinado recientemente que las variaciones en la concentración de hormonas tiroideas modifican la tasa de recambio de las aminas (71). Es probable entonces que exista un mecanismo de retroalimentación que modifique el metabolismo de TRH en las neuronas del hipotálamo, aunque este efecto pudiera no ser directo sobre la neurona TRHérgica, sino sobre alguna neurona aferente.

En cuanto a la liberación y degradación del TRH a nivel hipotalámico, en animales hipertiroideos se ha determinado que los niveles de TRH liberados a la sangre portal disminuye (72), y hasta el momento no se ha encontrado que la actividad de las enzimas que

degradan al TRH varíen en respuesta a cambios en los niveles de hormonas tiroideas. Otro de los efectos endócrinos del TRH sobre la adenohipófisis es la estimulación de la liberación de la prolactina (73). Se ha observado que los factores peptídicos que liberan a la prolactina en la rata se localizan en el núcleo paraventricular del hipotálamo, ya que lesiones en dicho núcleo impiden incrementos de la prolactina en sangre (74). Desde hace mucho tiempo se sabe que la dopamina es un potente inhibidor de la liberación de PRL y se le ha considerado como el principal regulador de la liberación de la prolactina en diferentes condiciones fisiológicas (75). Sin embargo, probablemente la tasa de secreción de PRL es el resultado de un balance entre el efecto inhibitorio de DA y los efectos estimulatorios de varios efectores que incluyen al TRH y otros neuropéptidos como son el péptido vasoactivo intestinal (76).

Existen evidencias que sugieren al TRH como un factor importante en la regulación de la liberación y del metabolismo de la PRL. El TRH es capaz de liberar PRL de la hipófisis de rata lactante in vitro e in vivo (77); inmunización pasiva con anti-TRH en rata lactante sometida a estímulo de succión por las crías impide el incremento de PRL en sangre (78). Aunado a estos hallazgos, se sabe que la estimulación del nervio mamario (que es estimulado durante la succión) induce la liberación de TRH a la sangre portal, al mismo tiempo que cesa la secreción de dopamina por la eminencia media (79). En cuanto al metabolismo de PRL en la adenohipófisis, el TRH es capaz de incrementar los niveles de ARNm de PRL en cultivos de células GH, al igual que ocurre con los estrógenos. Si bien, el TRH podría no participar en todas las condiciones fisiológicas donde ocurre la liberación de PRL, es claro

que en algunos casos es relevante y probablemente en éstos el metabolismo de la neurona TRHérgica podría modificarse para responder adecuadamente al cambio fisiológico.

Existen otros factores fisiológicas que podrían afectar el metabolismo del TRH hipotalámico, como es el ciclo circadiano (80). Muchos fenómenos fisiológicos dependen de estos ciclos que directamente repercuten en los niveles de varias hormonas. Específicamente la TSH oscila en forma circadiana en sangre (81) y esto pudiera ser una respuesta directa a una secreción circadiana del TRH. Se ha reportado que el TRH oscila durante el día alcanzando su mayor concentración en el hipotálamo a las 12:00; este ciclo difere entre las distintas áreas del hipotálamo e inclusive es inverso al del TRH extrahipotalámico inmunoreactivo (82).

También ocurren cambios en el metabolismo del TRH en respuesta a modificaciones del medio ambiente que afectan la homeostásis del organismo. Se ha reportado que al someter ratas a estrés por frío los niveles de TRH en sangre periférica se incrementan y este incremento se ve asociado con la presencia de grandes cantidades de TSH en la circulación (83). El pretratamiento con hormona tiroidea evitó la aparición del efecto estimulador sobre la secreción de TSH pero no se inhibió la liberación de TRH (84).

En resumen, las neuronas hipofisiotróficas, que sintetizan el TRH responsable de la liberación de TSH o la Prolactina, parecen estar involucradas en diferentes condiciones fisiológicas. Es importante entonces que la neurona TRHérgica reciba señales que reflejen el estado metabólico del organismo y que la neurona sea capaz de interpretar dicha información para coordinar la actividad metabólica del TRH y mantener los niveles de TRH disponible para su liberación en respuesta

a estímulos externos. Debido a los problemas metodológicos que se presentan al tratar de trabajar con los péptidos y las neuronas que los sintetizan (bajos niveles de péptidos y poblaciones celulares heterogéneas) aún se conoce poco de como la neurona TRHérgica modula su metabolismo en respuesta a los diferentes factores hormonales o nerviosos.

II.OBJETIVOS

La línea de investigación de nuestro grupo de trabajo, consiste en estudiar cuales son las etapas del metabolismo del TRH en la neurona hipotalámica que están sometidas a regulación (biosíntesis, liberación y/o degradación) y cuales son los efectores (neurotransmisores y/u hormonas) involucrados. Para esto se han elegido modelos fisiológicos en los cuales hay evidencias directas o indirectas de modificación en alguna etapa del metabolismo del TRH. En estos modelos se determinará si los eventos metabólicos de la neurona TRHérgica están afectados en respuesta a los cambios nerviosos u hormonales que se presentan en las condiciones fisiológicas de interés. Esto nos pudiera indicar si existe regulación sobre la neurona TRHérgica y el tipo de efectores.

El presente trabajo abarca una parte de dicho proyecto, que consiste en estudiar la biosíntesis de TRH en el hipotálamo de animales: a) cuyo eje tiroideo ha sido alterado, b) durante el desarrollo ontogénico y c) durante el ciclo circádico (trabajo realizado en colaboración con el M. en IBB L. Covarrubias)

Con estos modelos trataremos de constestarnos varias preguntas:

1) Influyen las hormonas tiroideas sobre la biosíntesis de TRH? De resultar afirmativo, dicho efecto sobre la biosíntesis de TRH pudiera ser un punto más del control retroalimentador que ejercen las hormonas tiroideas sobre el eje tiroideo

2) Cuando ocurre la aparición y el nivel máximo del ARNm de TRH durante el desarrollo ontogénico? Existe correlación entre los niveles de TRH y su ARNm? La ontogénia de las hormonas tiroideas marca el patrón ontogénico del TRH en el hipotálamo?

3) Existen variaciones circádicas en los niveles de ARNm de TRH

hipotalámico como ocurre con el péptido activo?

Aprovecharemos la respuesta a preguntas del número dos y tres para tratar de determinar si la expresión del gene de TRH es una etapa limitante para mantener los niveles de TRH.

Para medir la biosíntesis del TRH, elegimos medir los niveles del ARNm de TRH porque se ha observado, que existe generalmente una buena correlación entre los cambios en la transcripción de los genes de hormonas polipeptídicas y los niveles de su ARNm. Por otro lado los bajos niveles de síntesis de novo del péptido hacen difícil la utilización de métodos convencionales de bioquímica y de biología molecular.

La estrategia experimental consistió en medir los niveles del ARN mensajero específico para TRH empleando técnicas de hibridización ARN-ADN en membranas de nitrocelulosa, utilizando como rastreador el ADNc de hipotálamo de la rata donado por el Dr. H. Goodman, del Departamento de Medicina, del Centro Médico Tufts-New England de Boston. La cuantificación se realizó en muestras de ARN citoplásmico total de ratas que se encontraban en diferentes condiciones fisiológicas y en las cuales se midieron de manera paralela los niveles de TRH.

III. MATERIALES Y METODOS

III.1.- Mantenimiento y tratamiento de los Animales.

A) Ratas hipotiroideas.- Ratas Wistar machos de 60-70 días fueron mantenidas con alimento bajo en iodo por dos semanas (15 gr por rata); agua ad libitum y periodos de luz-obscuridad de 12 horas (7 AM-7 PM) todo el tiempo. Transcurridas las dos semanas con la dieta, a las ratas se les inyectó i.p. 200 μ Cide ^{131}I por 100 gr de peso corporal, y se les dejo dos semanas más con la misma dieta antes de sacrificarlas. Las ratas controles se mantuvieron bajo las mismas condiciones, pero alimentandose con alimento completo y no fueron inyectadas con ^{131}I . Los dos grupos de animales se sacrificaron por decapitación a las 13 horas del día: se colectó la sangre del tronco para posterior medición de hormonas tiroideas y se disecaron varias regiones del cerebro (hipotálamos, bulbos olfatorios, nucleo accumbens, cuerpo estriado) las que fueron rapidamente congelados con hielo seco.

B) Ratas en desarrollo y en ciclo circádico. Las ratas se mantuvieron desde que nacen con periodos de luz-obscuridad de doce horas y fueron destetadas de sus madres a los 25 días después del parto. Se emplearon ratas machos de 1, 5, 10, 20, 30, 45 y 60 días de edad los cuales, en el caso de la ontogenia cada grupo de ratas fue sacrificado a las 13 horas del día en un rango de una hora; para los experimentos de ciclo circádico grupos de animales de la misma edad fueron sacrificados cada 4 horas durante el día y noche también en un intervalo de una hora.

III.2.-Purificación de ARN citoplásmico total.

30-50 mg de tejido fueron homogenizados en 250 μ l de Sol I (50mM Tris-HCl pH=7.4, 25 mM NaCl, 5mM MgCl). El homogenado se transfirió a un tubo ependorf 1.5 ml esteril, al cual se le adiciona 10 μ l de

Tritón X-100 y se mezcla energicamente con el vortex. Con el fin de sedimentar los núcleos se adicionó 125 ul de sacarosa al 72% y se centrifugó a 12 000 rpm en microcentrifuga Beckman por 10 min. a 4 °C. Posterior a la centrifugación, se recogió la fracción citoplásmica y se le adicionó 125 ul de Sol II (6% SDS, 0.4 M NaCl 40 mM EDTA). Una vez que la fracción citoplásmica fue aislada, se procedió a purificar el ARN citoplásmico eliminando las proteínas. Para esto la preparación se sometió a tres extracciones con 1 volumen de fenol (el fenol se satura toda la noche con 25 mM de Tris-HCl pH=7.4, 0.1 M NaCl y 10 mM EDTA) y 1 volumen de cloroformo (cuando se purificó ARN de tejido cerebral la primera extracción se realizo con una relación 1:2). Por último se precipita el ARN, adicionando a la fracción acuosa NaCl 5M suficiente para obtener una concentración final de 0.2 M y 2 volúmenes de etanol absoluto frio y se guardan los tubos por 12 horas a -80 °C. Para recuperar el ARN citoplásmico, se centrifugo a 12 000 rpm en la microcentrifuga por 15 min. a 4 °C, se decanto el etanol, el precipitado se seco y resuspendio en agua tridestilada tratada con dietil pirocarbonato y autoclaveada. Se almacenaron los tubos con la solución de ARN purificado a -80 °C.

Es indispensable que todos los pasos antes de iniciar las extracciones de fenol se realicen lo mas rápido posible, para que la calidad del RNA sea aceptable.

III.3. Análisis de la calidad y cuantificación del ARN citoplásmico total.

Las muestras de ARN fueron sometidas a electroforesis desnaturante en minigel (longitud 7.5 cm y grosor 1 cm). El minigel se realizó con agarosa 1%, 2.2 M formaldehído y 10 mM de

amortiguador de fosfatos de sodio pH= 7.5 (1 X). Realizamos electroforesis horizontal en geles (capacidad de los pozos 25 ul) sumergidos en amortiguador de fosfatos 1 X que fué reciclado durante el tiempo de duración de la electroforesis. La corrida se realizó a 30V aproximadamente por 2.5 horas. Antes se someter el ARN a electroforesis, se desnaturalizaron las muestras por tratamiento con 2.2 M de formaldehído, 1X de amortiguador de fosfatos, 50% formamida calentando a 65 °C por 15 min. Inmediatamente después de la incubación se colocaron en hielo antes de poner sobre el gel.

Los ARNs fueron observados en el gel por exposición a luz ultravioleta (UV), después de teñirlo con bromuro de etidio (5ug/ml) por 5 min., y lavarlo con agua durante toda la noche, posteriormente se toma una fotografía del gel con exposición de luz ultravioleta.

Para la cuantificación de las muestras de ARN, en el negativo de la fotografía se realiza un barrido densitométrico (Densitómetro Hoefer) perpendicular a las bandas de ARN ribosomal que se observaron en cada una de las muestras. En el análisis densitométrico se obtuvo un valor de absorbancia que es directamente proporcional a la intensidad de la banda en un cierto rango de concentración de ARN. Con muestras estandar (de concentración ya conocida) que se corren a la par que las muestras problema, se construyó una curva graficando Unidades absorbancia vs ug de RNA, y con la parte lineal de esta curva se calcularon los ug de ARN de las muestras problema al interpolar en ella los valores de area obtenidos para cada una de ellas (Fig. 7).

III.4. Detección y cuantificación del mensajero específico para IRH.

Se realizó una hibridación tipo "Northern", empleando de 7-10 ug de ARN citoplásmico total. Después de someter el ARN a electroforesis

en condiciones desnaturalizantes (ver inciso 3), se transfirió el ARN del gel a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell, poro 0.45 μm). Pevio a la hibridización la membrana se prehibridizó a 42 °C por un mínimo de tres horas, la hibridización se realizó también a 42 °C por 24 horas. Se emplearon en la hibridización 3-5 X 10⁶ cpm de la sonda por ml de amortiguador de hibridización. La sonda es el ADNc para TRH de hipotálamo de rata (donado por el Dr. H. Goodman) marcado por "nick translation" con αCTP (^{32}P) 3000 Ci/mmol obteniendo una actividad específica de 4-5 X 10⁶ cpm/ μg de ADN.

La cuantificación del ARN específico de TRH se realizó por densitometría de las bandas en la autoradiografía obtenida de la exposición de los filtros de nitrocelulosa hibridizados.

IV. RESULTADOS.

IV.1.- Optimización metodológica.

Para los estudios de la regulación de la biosíntesis de péptidos bioactivos en el SNC, se presentan dos limitantes importantes: 1.- Al tratar de medir la biosíntesis del péptido en una región determinada del cerebro de animales individuales, la cantidad de tejido disponible para trabajar es pequeña. 2.- Los niveles de ARNm específico para estos péptidos son muy bajos en el SNC. Por lo tanto se necesitan optimizar métodos que resuelvan estos problemas.

A.- Purificación y cuantificación del ARN citoplásmico total

Se probaron tres métodos diferentes de extracción de ARN: cloruro de guanidina-proteinasa K (85), tiocianato de guanidina (86) y fenol-cloroformo (método descrito en materiales y métodos). Se obtuvieron mejores resultados con el micrométodo del fenol-cloroformo, en el que el rendimiento de ARN total fué del doble con respecto a los otros métodos. Logramos obtener aproximadamente 30 ug de ARN total a partir de un hipotálamo (50 mg de tejido fresco). El método tiene además la ventaja de ser barato y rápido. Los ARN obtenidos fueron monitoreados en electroforesis en gel y como se puede apreciar en la Fig. 7, la calidad de los ARNs obtenidos por éste método fué aceptable. Todas las muestras fueron cuantificadas contra una curva estandar (lineal entre 0 y 2 ug de ARN) corrida en el mismo gel de las muestras problema.

B.- Identificación del ARN mensajero específico de TRH.

a).- Pruebas de especificidad. La identificación del ARNm específico para TRH fué realizada por hibridaciones tipo "Northern", empleando como sonda ADNc para TRH aislado del hipotálamo de rata (39).

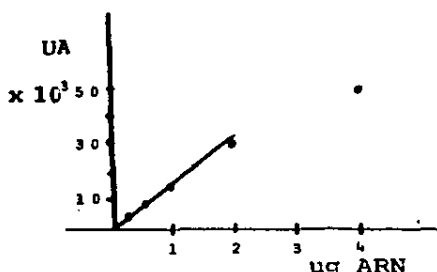
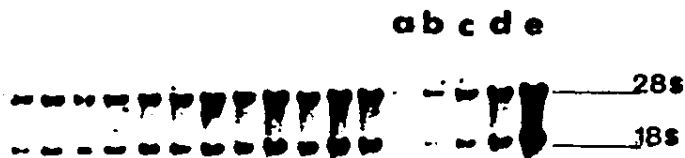


FIGURA 7.

Integridad y cuantificación de las muestras de ARN citoplásmico total obtenidas del hipotálamo de la rata. En la figura se observa la fotografía de una electroforesis en gel de muestras de ARN que fueron teñidas con bromuro de etidio y posteriormente fotografiadas con exposición a luz U. V. Los carriles a, b, c, d, e, corresponden a diferentes cantidades de ARN total (0.25, 0.5, 1, 2, 4 ug respectivamente, la cantidad fue determinada por dilución de una muestra de ARN la cual se había cuantificado por medición de absorbancia a 260 nm), estas muestras fueron empleadas como curva estandar, lo que nos permitió cuantificar la concentración de las muestras problema. En los carriles de la izquierda se muestran algunas de las preparaciones de ARN citoplásmico total aisladas a partir de un hipotálamo de rata adulta. Para la realización de la curva que se observa en el recuadro, a cada una de las muestras de la curva estandar se le realiza con un densitómetro (Hoeffler) un barrido de absorbancia perpendicular a las bandas de ARN ribosomal que se observan en la fotografía, posteriormente se calcula el área bajo la curva de los dos picos obtenidos en el barrido y este valor se grafica contra ug de ARN total.

Utilizando ARN de hipotálamo de rata fracción poly A+ se observó que el ADNc detectó solo una banda de 1700 nucleótidos (Fig. 8), lo que corresponde a lo reportado por Lechan et al (39). La especificidad de la hibridación se infirió porque la banda se mantuvo a pesar de los lavados estrictos del filtro. En este experimento hibridizamos también ARN poly A+ de cerebro extrahipotalámico y no detectamos señal (Fig. 8). Si bien el TRH se encuentra distribuido en todo el cerebro, la mayor concentración se localiza en el hipotálamo y la concentración de ARNm de TRH extrahipotalámico es entonces muy baja por lo que no se detectó con nuestro método. De ser una señal inespecífica se hubiera encontrado presente en la población de ARNm extrahipotalámico.

b).- Sensibilidad del método de hibridación. Para determinar como se modifica la expresión del gene de TRH en el hipotálamo de ratas sometidas a diferentes condiciones fisiológicas, era necesario poder cuantificar estos cambios en un solo hipotálamo. La sensibilidad del método fué determinada mediante diluciones de ARN poly A+ de hipotálamo de rata (10, 2.5, 0.062, 0.015, 0.004 ug) con ARN total de cerebro, observandose que el límite de sensibilidad es de 0.015 ug (Fig. 9). En éste experimento se corrió una muestra de ARN citoplásmico total (10 ug) obtenido de un solo hipotálamo el ARNm de TRH en la cual es fácilmente detectable (Fig. 9).

c).- Localización del mensajero de TRH en diferentes regiones del cerebro y de otros órganos. Como se ha descrito anteriormente el TRH se encuentra ampliamente distribuido en el SNC. Como una prueba más de la especificidad del método se intentó detectar el ARNm de TRH en: hipotálamo, bulbos olfatorios, núcleo estriado, núcleo acumbens e hipófisis. El mensajero de TRH se detectó solo en hipotálamo y

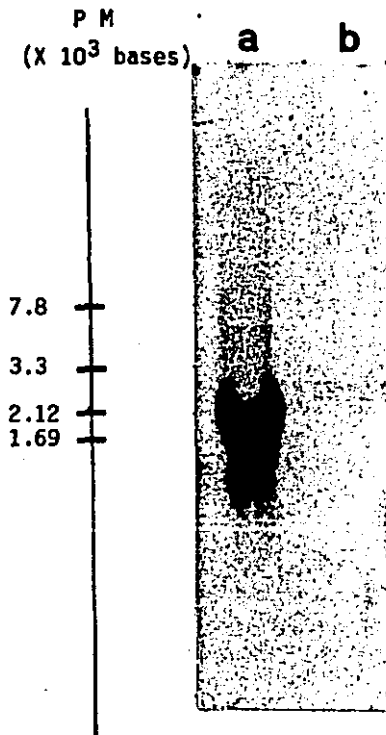


FIGURA 8.

Identificación de ARNm de TRH de cerebro de rata a).- 20 ug de ARN poly A+ de hipotálamo de rata, b).- 20 ug de ARN poly A+ de cerebro extrahipotalámico de rata. Autoradiografía de la hibridización de ARN fracción poly A+ de hipotálamo y cerebro de rata, con el ADNc para TRH aislado del hipotálamo de la rata. Se hibridizó a 42 °C con la solución de hibridización (50% formamida, 6X SSC, 1X denhardtts, 50 mM fosfato de sodio pH=7, 150 ug de ADN de esperma de salmón/ml de solución de hibridización, 5 X 10⁶ cpm/ml de la sonda marcada por "nick translation" con actividad específica 5 X 10⁸ cpm/ug de ADN) durante 36 horas, y la película se reveló después de 24 horas de exposición.

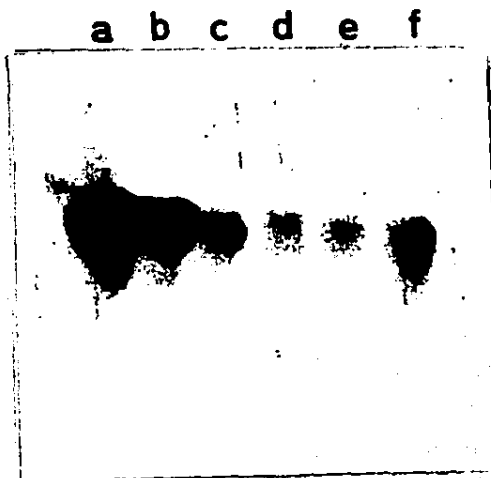


FIGURA 9.

Sensibilidad del método de cuantificación de los niveles de ARNm de TRH. Se colocaron muestras de 10 ug de ARNm de cerebro con diferentes porcentajes de ARN fracción poly A+ de hipotálamo de rata (carril a: 100; b: 25; c: 6; d: 1; e: 0.4). En el carril f se colocó una muestra con 10 ug de ARN citoplásmico total de hipotálamo de rata. Las muestras se hibridizaron con el ADNc de hipotálamo de rata a 42 °C por 24 horas, empleando como buffer de hibridización: 50 % formamida, 6X SSC, 1X denhardtts, 50 mM fosfato de sodio pH=7, 150 ug de ADN de esperma de salmón/ml de solución de hibridización, 10% dextran sulfato, 4×10^6 cpm/ml de la sonda (2.7×10^8 cpm/ug de ADN). Las señales observadas fueron obtenidas en 24 horas de exposición.

bulbos olfatorios, lo que está de acuerdo con el hecho de que en estas cinco regiones solo estas dos tienen alta concentración de mensajero. Nuestros resultados, así como los reportados, indican que en las diferentes regiones del cerebro solo existe una especie ARNm para TRH de peso molecular de 1700 pb (39). También tratamos de ver si fuera del cerebro se puede detectar el ARN mensajero para TRH. Elegimos el páncreas por ser un órgano que sintetiza TRH (en etapas tempranas del desarrollo) y al bazo como un control negativo. Los resultados demostraron la presencia del ARNm del TRH únicamente en el páncreas de animales jóvenes (Fig. 10) de acuerdo con lo reportado por otros autores. El peso molecular del ARNm fue el mismo que en el cerebro.

IV.2. Influencia del estado tiroideo sobre la biosíntesis de TRH.

Como se mencionó en la introducción, el TRH controla de manera importante el eje tiroideo. El efecto retroalimentador de las hormonas tiroideas sobre la hipófisis es bien conocido, pero no así sobre el hipotálamo. Con este objetivo, estudiamos el efecto de las hormonas tiroideas sobre la biosíntesis de TRH.

Para obtener ratas hipotiroideas elegimos el método de destrucción de la glándula tiroidea por tratamiento con yodo 131, que presenta ventajas con respecto al método quirúrgico o al tratamiento con propiltiouracilo. En el método quirúrgico, al remover la glándula tiroidea se elimina también la glándula paratiroides, lo que ocasiona problemas en el metabolismo de calcio por lo que es indispensable su administración para mantener vivo al animal. En el caso de tratamientos con propiltiouracilo además de provocar hipotiroidismo por inhibición de la captura de yodo por la tiroidea, se ha visto que incrementa los niveles de endorfinas en la tiroidea, por lo que es



FIGURA 10.

Distribución del ARNm de TRH en diferentes regiones del cerebro y pancreas. Se observan muestras representativas de la determinación por hibridización con el ADNc para TRH de rata de la presencia del ARNm de TRH en muestras de 7 ug de ARN citoplásmico de diferentes regiones del cerebro: b) hipotálamo, c) bulbos olfatorios, d) núcleo acumbens, e) cuerpo estriado. En el carril a) se observa la hibridización de una muestra de 4 ug de ARN de pancreas (obtención por extracción con tiocianato de guanidina) de rata de un día de nacida. Las condiciones de hibridización son iguales a las descritas en la figura 9.

probable que produzca en los animales otros efectos que modifiquen la actividad de células nerviosas. El método que empleamos consistió en someter a las ratas a dietas bajas en yodo por algunos días, induciendo disminución del yodo en el organismo; al inyectar yodo radioactivo éste es captado más eficientemente por la tiroides, causando necrosis por el efecto de la radiación. El grado de hipotiroidismo fue verificado mediante la determinación, por radioinmunoensayo, de los niveles de T₃ en sangre. Los niveles de T₃ correspondieron a 22% del control (Fig. 11). Se observó un cambio en los niveles de ARNm de TRH en los animales hipotiroideos. Se cuantificó el efecto en el hipotálamo y los bulbos olfatorios esperando tener estos últimos como control. Sin embargo, observamos un aumento significativo del ARNm en las dos regiones. Por densitometría se cuantificó la señal de hibridación observándose un pequeño incremento de los niveles de ARNm en el hipotálamo (10% arriba del control) y un mayor efecto en los bulbos olfatorios (80% arriba del control). Los resultados se muestran en la Fig. 11.

IV.3. Ontogenia del ARN mensajero de TRH.

El patrón ontogénico de TRH inmunoreactivo (ir) en el hipotálamo de la rata ha sido determinado desde hace varios años, encontrándose que los niveles de TRH empiezan a incrementarse en los primeros días después del nacimiento alcanzando su máximo en la edad adulta. Existe además un patrón ontogénico de TSH y hormonas tiroideas. Nosotros cuantificamos los niveles de ARNm durante la ontogenia con el objeto de determinar si existe correlación entre los niveles de ARNm y el TRH ir en hipotálamo. El TRH y su ARNm fueron medidos en ratas sacrificadas a las 13 horas, y a 1, 5, 10, 20, 30, 45, 60 días después del

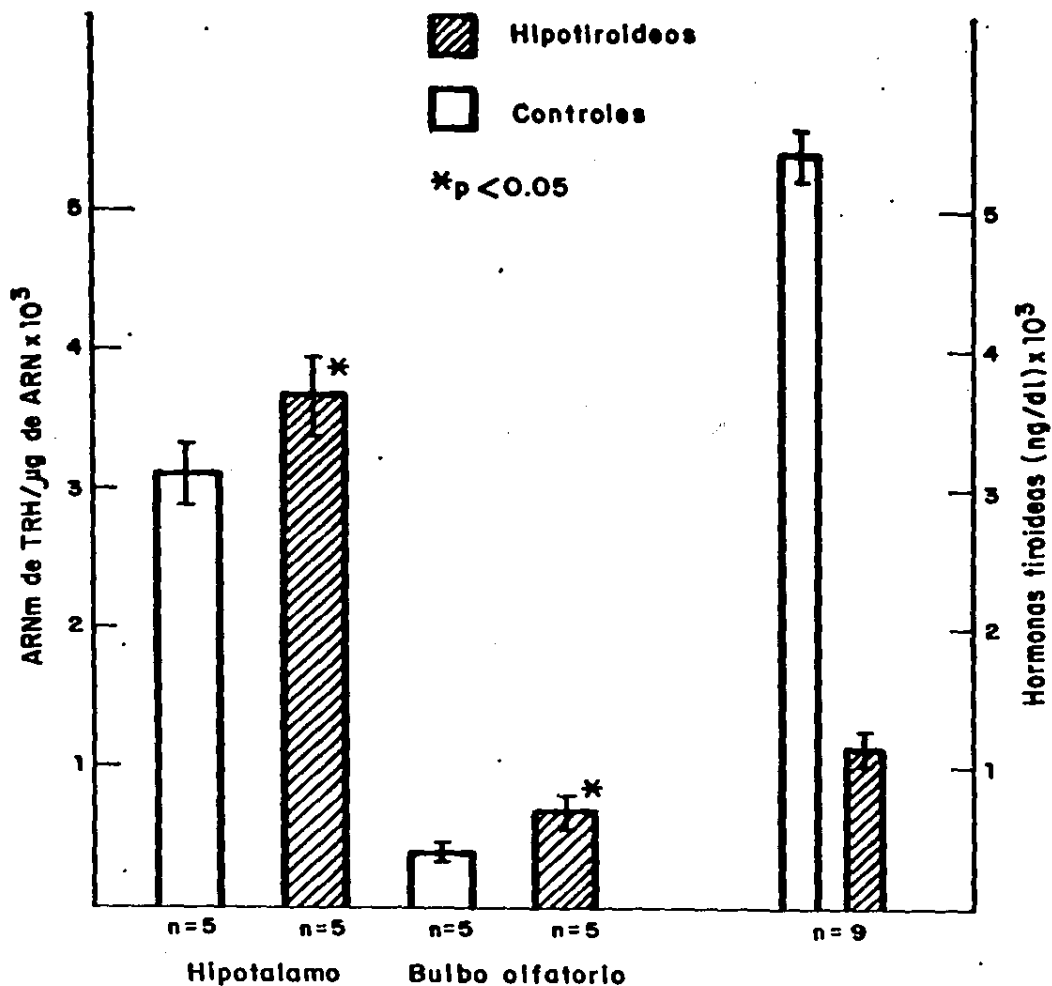


FIGURA 11.

Efecto del hipotiroidismo sobre los niveles del ARNm de TRH en hipotálamo y bulbo olfatorio de la rata. En la gráfica se presenta el promedio (\pm error estándar de la media) de los valores obtenidos por densitometría en hipotálamo y bulbos olfatorios de ratas hipotiroides y controles. El valor de cada muestra fué normalizado por μg de ARN total. El grado de hipotiroidismo fué verificado por medición de T_3 en suero en los animales tratados y controles. En la gráfica se presenta también el promedio (\pm el error estándar de la media) de los valores de T_3 medidos por radioinmunoensayo. * Prueba t de student, diferencia significativa con el control $p < 0.05$.

nacimiento. El ARNm para TRH en el hipotálamo fué apenas detectable el primer día, incrementándose aproximadamente 10 veces hasta el día 20, para posteriormente decaer a los días 30 y 45. El TRH ir siguió el mismo patrón, solo que el incremento máximo entre 1 y 20 días fué de aproximadamente 5 veces y la caída a los 30 y 45 días fué menor que la del RNA (Fig. 1 del artículo).

IV.4. Efecto del ciclo circadiano sobre los niveles de ARNm de TRH en el hipotálamo.

El ARNm de TRH medido en ratas adultas a diferentes horas del día presentó un pico máximo a las 18 horas, al igual que el TRH ir (Fig. 2 del artículo). Mientras que el incremento en TRH ir (razón cresta/valle) fue de 1.5 veces, en el ARNm fue de 3 veces.

El ritmo circadiano fué determinado a diferentes edades con objeto de ver si la relación ARNm-TRH se preservaba. Observamos variaciones en el patrón del ciclo circadiano durante la ontogenia, estabilizándose éste hasta la edad adulta (45 días). A todas las edades detectamos variaciones durante el día, encontrándose el pico máximo a diferentes horas. La amplitud también varió y sin embargo siempre existió una correlación entre el patrón del ARNm y el TRH (Fig. 3 del artículo).

Se analizó el desarrollo a diferentes horas del día y se observó que el patrón es similar al descrito a la hora 13 del día (Fig 12).

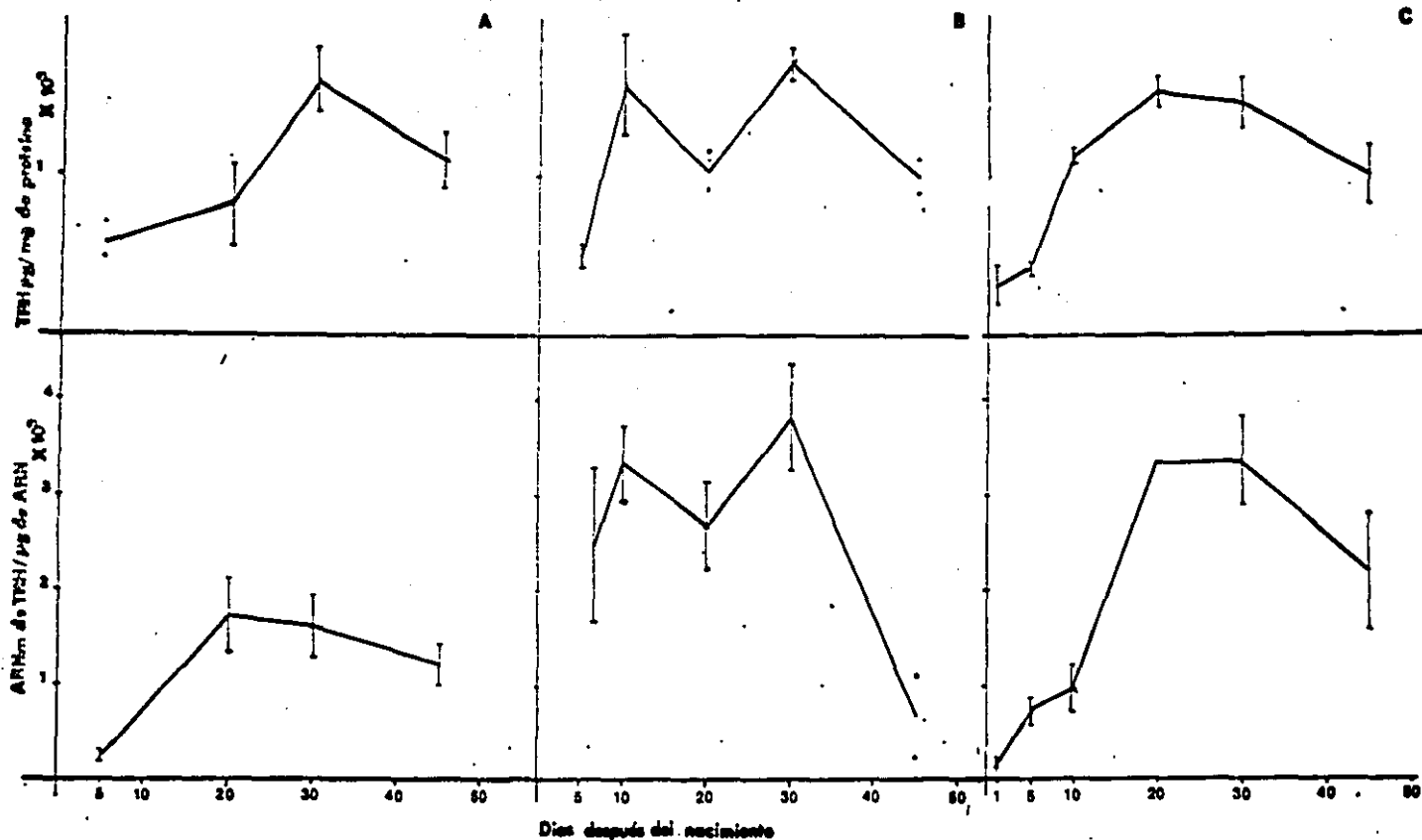


FIGURA 12.

Patrón ontogénico del TRH y su ARNm a diferentes horas del día en el hipotálamo de la rata. En las gráficas se muestran las variaciones que sufren el TRH y el ARNm durante el desarrollo a diferentes horas del día: A.- 1 A. M., B.- 7 A.M., C.- 19 P.M. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones + error estándar de la media. (En los puntos donde no se presentan barras del error, se graficó el valor experimental obtenido).

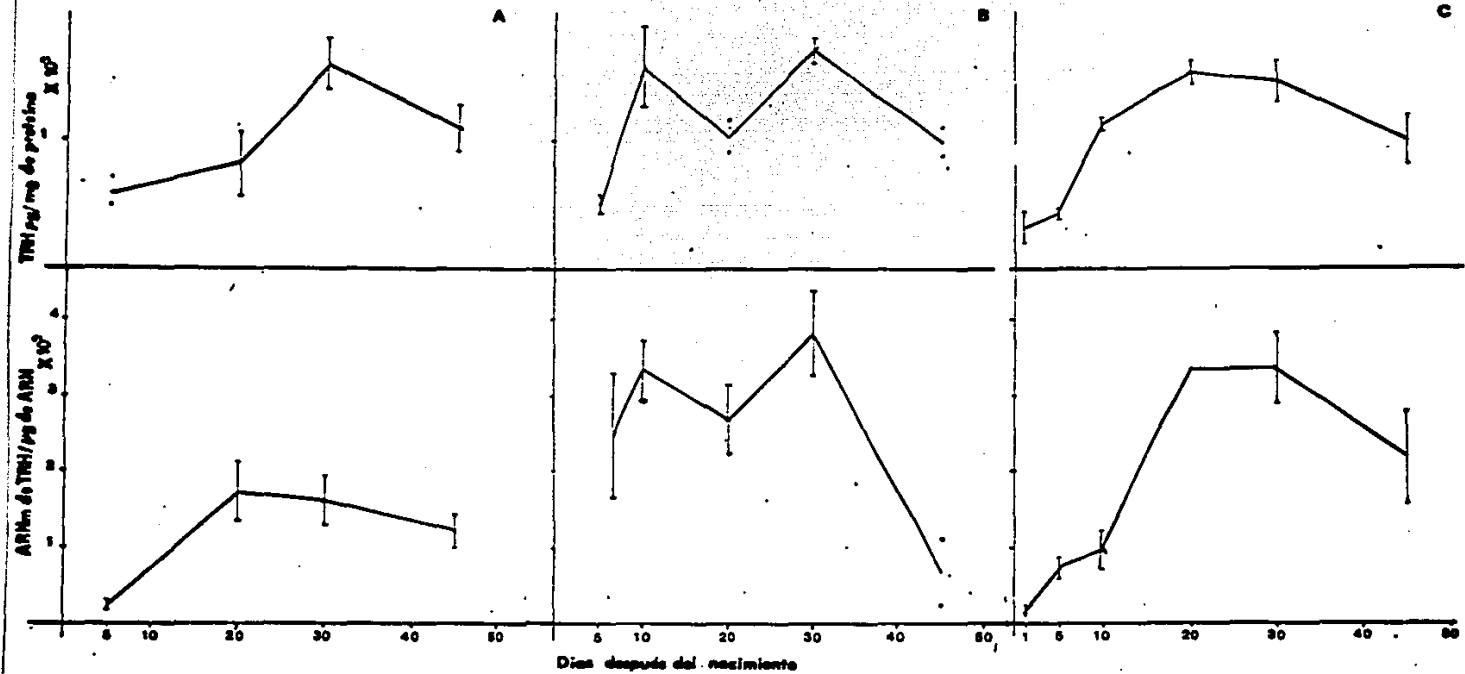


FIGURA 12.

Patrón ontogénico del TRH y su ARNm a diferentes horas del día en el hipotálamo de la rata. En las gráficas se muestran las variaciones que sufren el TRH y el ARNm durante el desarrollo a diferentes horas del día: A.- 1 A.M., B.- 7 A.M., C.- 19 P.M.. Cada punto representa el promedio de tres determinaciones + error estándar de la media. (En los puntos donde no se presentan barras del error, se graficó el valor experimental obtenido).

V. DISCUSION.

Las neuronas peptidérgicas del hipotálamo que regulan el funcionamiento de la adenohipófisis, son capaces de integrar numerosas señales internas y externas al organismo. La manera por la cual se lleva a cabo la integración de toda la información es poco conocida. Es posible que las señales modifiquen el metabolismo de la neurona peptidérgica a varios niveles (síntesis de péptidos, transporte a través del axón, liberación e inactivación). Más aún, probablemente existan puntos de regulación más finos, es decir, que dentro de las mismas etapas, uno o más pasos pueden estar modulados como respuesta a la información que recibe la neurona. Por ejemplo; la síntesis de péptidos comprende varias etapas: transcripción del gene, procesamiento y transporte del RNA de núcleo al citoplasma, vida media del mensajero, traducción y modificaciones posttraduccionales de la proteína. Por inferencia con otros sistemas celulares no neuronales se sugiere que estos eventos pueden estar sometidos a control. Sin embargo en la actualidad se conocen más ejemplos de efectores (hormonas, neurotransmisores y actividad eléctrica) que modifican la actividad transcripcional.

Como se mencionó en los objetivos nuestro interés consiste en entender, la regulación de la biosíntesis del TRH en la neurona peptidérgica y definir cuales son los posibles efectores involucrados en el control. La estrategia del presente trabajo consistió en medir los niveles de ARNm en diferentes condiciones fisiológicas, como una primera etapa que refleje posibles modificaciones en la transcripción del gene de TRH.

El método de extracción de ARN y detección fue optimizado,

logrando la detección del ARN específico para TRH en una muestra de 10 ug de ARN citoplásmico total aislado de un hipotálamo de rata. Empleando este método analizamos la distribución del mensajero de TRH en algunas regiones del cerebro donde se había detectado TRH, así como en páncreas y bazo. Los resultados de otros autores empleando técnicas de hibridación *in situ*, confirmaron nuestros datos y permitieron identificar otras zonas que contienen el mensajero de TRH pero en los que no se había descrito la existencia de TRH ir (sustancia gris periacueductal). Estos resultados permiten identificar las zonas responsables de la síntesis del péptido, ya que su localización por inmunoreactividad solo presenta información sobre la presencia de este en las terminales nerviosas.

Medimos las variaciones en el ARNm para TRH en tres condiciones fisiológicas diferentes, en las cuales participan varios de los posibles efectores que regulan la biosíntesis de TRH (hormonas y neurotransmisores). Estas condiciones fueron la influencia del estado tiroideo; el desarrollo ontogénico y el ciclo circadiano.

Como ya se ha dicho en la introducción, en el eje neuroendócrino hipotálamo-hipófisis-tiroides participan el TRH, la TSH y las hormonas tiroideas, así como mecanismos de retroalimentación de las células tiroideas hacia las células de la adenohipófisis por medio de la liberación de T3 y T4 de la adenohipófisis. Desde hace tiempo ha surgido la pregunta sobre si este mecanismo de control existe a nivel hipotalámico, puesto que parecería lógico pensar que exista coordinación en el funcionamiento de los tres tipos celulares que constituyen el eje tiroideo. Si bien varios autores han intentado determinar el efecto de las hormonas tiroideas sobre la neurona TRHérgica, empleando como parámetro la cuantificación de los niveles de

TRH ir en el hipotálamo de animales hipotiroides e hipertiroideos, y la mayoría de los resultados parecen indicar que no hay variación en el contenido de TRH en el hipotálamo. Una posible explicación a estas observaciones es que los niveles de TRH intracelular son el resultado de un balance entre lo que se sintetiza, libera y degrada, por lo que, por ejemplo, un incremento en la síntesis puede acompañarse de aumento en la liberación sin que varíe la concentración intracelular del péptido. Con la información con que se cuenta y debido principalmente a problemas metodológicos, hasta el momento, no es fácil determinar si ambos eventos están coordinados. Así, por lo que respecta a la regulación de la liberación de TRH de la eminencia media no se ha podido determinar si ésta se modifica en respuesta a variaciones de las hormonas tiroideas por problemas en la determinación de TRH en sangre portal. Por otro lado, la actividad degradativa intracelular del TRH no parece jugar un papel importante en el control de la concentración de TRH a nivel hipotalámico, ya que en animales hipotiroides e hipertiroideos no hay variaciones de la actividad de la PGA I (56). Además, en experimentos en los que se suministraron tanto in vivo como in vitro inhibidores de las enzimas solubles (que degradan al TRH in vitro y que tienen una localización intracelular), no se observaron cambios en el contenido de TRH hipotalámico (88). Con estos datos, no está claro si la neurona TRHérgica hipotalámica es blanco de las hormonas tiroideas. Con el fin de determinar si estas neuronas son blanco de la retroalimentación por las hormonas tiroideas como ocurre con las células adenohipofisarias, determinamos los niveles de ARNm de TRH y el TRH ir en el hipotálamo de animales hipotiroides. En estos animales se encontró aumento significativo de los niveles de ARNm de

TRH con respecto al control. Como se ha reportado (89) no observamos variaciones en el contenido de TRH en la eminencia media. Los resultados obtenidos sugieren que las hormonas ejercen mecanismos de retroalimentación negativa a nivel de la biosíntesis de TRH. Al mismo tiempo por hibridización *in situ* otros autores determinaron que, en animales hipotiroideos los niveles de ARNm de TRH se incrementan 100% en el núcleo paraventricular del hipotálamo (90). La diferencia tan marcada en el efecto que observamos y el reportado por hibridización *in situ*, se debe a la dilución que se produce en el mensajero específico cuando se trabaja con el hipotálamo completo en donde existen muchas neuronas que sintetizan TRH en otros núcleos hipotalámicos que probablemente no participan en el control del eje. Estos resultados no indican si el efecto de las hormonas tiroideas es directo sobre la neurona que sintetiza TRH o sobre las neuronas aferentes. Por un lado se ha descrito que las variaciones en las hormonas tiroideas afectan el recambio de la noradrenalina (NA) en el núcleo paraventricular, y como la NA también estimula la liberación de TRH. En este sentido, las hormonas tiroideas pudieran afectar la actividad de las neuronas aferentes responsables de estimular la liberación del TRH, afectando así la síntesis del ARNm de TRH a través de cambiar la tasa de secreción controlar los niveles de ARNm de TRH a través de cambiar la tasa de secreción de NA. Por otro lado, el aislamiento y secuencia del gene de TRH de la rata ha revelado posibles regiones de control en el extremo 5' ya que se ha identificado una secuencia homóloga a la región de control por hormonas tiroideas en varios genes regulados por estas hormonas. Por lo tanto no podemos descartar que las hormonas tiroideas ejerzan un efecto directo sobre las neuronas TRHérgicas. Además en el extremo 5' del gene de TRH también existe una secuencia que es

característica de los genes que son regulados por AMPc (91).

El aumento en los niveles de ARNm de TRH en las neuronas del núcleo paraventricular en ratas hipotiroideas, juega un papel importante para el restablecimiento de los niveles de hormonas tiroideas. En este tipo de animales esperamos que la liberación de TRH de la eminencia media se encuentre aumentada y de existir liberación importante de TRH en esta situación, los niveles de TRH en la eminencia media pudieran bajar. Sin embargo este efecto no parece ocurrir (92). Hemos observado que los niveles de TRH hipotalámico en otras condiciones también permanecen constantes, como es el caso de experimentos de liberación in vitro de TRH donde rebanadas de hipotálamo son estimuladas con alto K⁺, y aún después de liberarse una cantidad significativa del TRH, la poza intracelular de TRH no cambia, lo que sugiere que las últimas etapas biosintéticas del TRH se aceleran y de esta manera existe coordinación entre la biosíntesis y la liberación de TRH a nivel de la terminal nerviosa (93). Por otro lado, nuestro grupo y otros investigadores se ha observado que en ratas hipotiroideas la actividad de la PGA II se disminuye en la adenohipófisis; ayudando así a incrementar el efecto del TRH, al disminuir su degradación en la célula blanco. Como he dicho anteriormente pueden existir varios puntos sensibles a regulación por las hormonas tiroideas, he mencionado dos ejemplos donde se observan cambios es la actividad fisiológicas de las células involucradas en el eje tiroideo, y como se puede observar, estos cambios están coordinados para mantener el control homeostático del organismo.

Es conocido que las hormonas tiroideas son importantes en el metabolismo de muchas células, siendo por ejemplo indispensables en el desarrollo del cerebro. Testigo de este papel ubicuo, está el hecho de

que sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo. Dado que las hormonas tiroideas participan en la actividad metabólica de muchas células, requerimos medir los niveles de ARNm de TRH en otro grupo de neuronas para determinar la especificidad del efecto que observamos en el hipotálamo, ya que no esperamos un efecto generalizado en todas las neuronas que sintetizan TRH, pero si en aquellas donde el TRH participan en el control de los niveles de T_3 y T_4 . Elegimos al bulbo olfatorio como un control negativo por ser una región en la cual detectamos fácilmente el ARN mensajero específico por nuestro método. Medimos los niveles de ARNm de TRH en bulbo olfatorio de animales hipotiroideos, encontrando que, al igual que en hipotálamo, los niveles del ARNm se incrementan. Hasta el momento no tenemos ninguna explicación fisiológica para el efecto observado en el bulbo olfatorio, pero los resultados sugieren que las hormonas tiroideas inducen un efecto en el mismo sentido que en el núcleo paraventricular del hipotálamo. No parece existir una respuesta generalizada en todas las neuronas TRHérgicas puesto que en el núcleo reticularis del tálamo y otras zonas del hipotálamicas otros autores no observaron ningún cambio (90, 94).

Durante el desarrollo ontogénico en la rata se ha descrito que los patrones que siguen la TSH y hormonas tiroideas, difieren del patrón del TRH en el hipotálamo. La TSH y la T_3 alcanzan niveles máximos a los 15 días después del nacimiento y el TRH alcanza su máximo a los 30 días. El patrón ontogénico del TRH puede estar influenciado por la maduración de las neuronas hipotálamicas, los niveles de hormonas tiroideas y la integración del eje tiroideo. Probablemente podríamos descartar a las hormonas tiroideas como responsables principales del patrón de desarrollo, puesto que inducen efectos negativos sobre la

expresión del gene de TRH, y que cuando la T_3 circulante se encuentra en sus valores normales en la rata, los niveles de ARNm de TRH aún siguen aumentando. Para delimitar los efectos que regulan la expresión del gene de TRH en la ontogenia, sería necesario determinar de manera aislada cuales son los efectores que regulan la actividad biosintética en la neurona TRHérgica. Para examinar esta posibilidad, en nuestro grupo se están utilizando cultivos primarios de neuronas hipotalámicas, con la intención de que los resultados que se obtengan de estos estudios in vitro se integren con aquellos sobre el desarrollo del hipotálamo in vivo, de tal manera que permitan tener una visión más completa de los posibles eventos que regulan la expresión del gene de TRH durante la ontogeneia.

Por otro lado, en el páncreas, hemos observado que el desarrollo del TRH y de su mensajero es inverso al del hipotálamo, ya que los niveles mayores de TRH y del ARNm específico se encuentran en los primeros días del nacimiento (1-5 días) y posteriormente decaen a valores casi indetectables. La disminución tanto del ARN mensajero como del TRH, coincide con el incremento en los niveles circulantes de hormonas tiroideas. Debido a que hay un incremento en el contenido de TRH en páncreas de ratas tiroidectomizadas es probable que en éste tejido el gene de TRH este también bajo el control negativo de las hormonas tiroideas. Por lo que el patrón ontogénico observado puede estar principalmente relacionado al efecto de las hormonas tiroideas.

Al igual que la mayoría de los mensajeros extracelulares, el TRH presenta un ciclo circádico. Se ha reportado en la literatura que en el hipotálamo de la rata el contenido de TRH muestra variaciones circádicas encontrándose niveles más altos a las 13 horas del día;

concentración de la TSH en plasma. Nosotros tratamos de determinar si estas variaciones en el contenido de TRH estaban coordinadas con cambios en los niveles de ARNm de TRH. Encontramos que el ciclo de TRH coincide con el de su ARN mensajero en el hipotálamo de la rata, es decir que los picos máximos tanto del TRH como de su ARN mensajero coinciden. Esto sugiere que el ARNm de TRH sintetizado durante este pico servirá para la producción del TRH ir de alguno de los ciclo siguientes, puesto que el TRH se sintetiza en el soma de la neurona como un precursor, y este es procesado a TRH durante su viaje a la terminal en donde se acumula, lo que implica que debe existir un cierto tiempo desde que se traduce el ARNm de TRH hasta que se obtiene el péptido maduro. Debido a que los cambios observados son muy amplios, uno puede pensar que gran parte de los núcleos hipotalámicos están ciclando de manera coordinada. Cuales son las señales que determinan esta coordinación? Tratamos de determinar si las variaciones en el ARNm de TRH coinciden con variaciones en los niveles de T_3 en suero pero no encontramos correlación como era de esperarse. Tampoco parece ser una respuesta a la luz debido a que los cambios en el ARNm de TRH no coinciden con los periodos de luz-obscuridad a los que están sometidas las ratas. Este modelo fisiológico resulta de gran interés debido a que pudieramos integrar los eventos inducidos por efectores que regulen la liberación de TRH (responsable de coordinar el ciclo de la TSH en plasma) y la transcripción del gene de TRH en el núcleo paraventricular. Si este fuera el caso, podríamos determinar la cinética de inducción de la transcripción y liberación del TRH en la neurona TRHérgica hipotalámica.

En conclusión, nuestros datos sugieren que la neurona TRHérgica hipotalámica modifica la biosíntesis de TRH en respuesta a los niveles

de hormonas tiroideas así como a factores neurales por determinarse. Por otro lado, nuestras observaciones parecen sugerir que, los niveles de TRH están determinados principalmente por la tasa de síntesis del péptido.. Si bien hemos observado cambios de los niveles de ARNm de TRH en las tres condiciones fisiológicas estudiadas, no podemos decir si estos cambios son consecuencia de un cambio del nivel de la transcripción o de la vida media del mensajero de TRH. La siguiente etapa de este trabajo consistirá en determinar si los cambios observados se deben a modificación en la tasa de transcripción del ARNm de TRH.

REFERENCIAS.

- 1.- Chemical Signaling Between Cell, In: Molecular Biology of the Cell, (B. Alberts, D. Bray, L. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson), Ed. Garland Publishing, INC., New York & London, 1983, 717-720.
- 2.- Solomon H. Snyder, 1985, The Molecular Basis of Communication Between Cells, Scientific American, 253(4) : 114-123.
- 3.- Darnell J., Lodish H., Baltimore D., 1986, Cell-to-Cell Signaling: Hormones and Receptors, In: Molecular Cell Biology, Scientific American Books, 667-713.
- 4.- Berridge M. J., 1985, The Molecular Basis of Communications within the cell, Scientific American, 253, 142-152.
- 5.- Catterall W.a., 1984, The Molecular Basis of Neuronal Excitability, Science, 223, 653-515
- 6.- Barnard E.A., Darlison G. M., Seeburg P., 1987, Molecular biology of the GABA receptor: the receptor/channel superfamily, TINS, 10, 504-526
- 7.- Nishizuka Yasutomi, 1986, Studies and Perspectives of Protein Kinase C, Science, 233, 305-310.
- 8.- Burwen S. J., and Jones A. L., 1987, The association of polypeptide hormones and growth factors with the nuclei of target cells, TIBS, 12, 159-162.
- 9.- Comb M., Hyman S. E. and Goodman H. M., 1987, Mechanisms of trans-synaptic regulation of gene expression, TINS, 10, 473-478
- 10.- Lübke A., Schaffner W., 1985, Tissue-specific gene expression, TINS, 100-104
- 11.- Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. A., 1987, Regulation of inducible and Tissue-specific gene expression, Science, 236, 1237-1244
- 12.- Spelsberg T., Hora J., Horton M., Goldberger A., Littlefield B., Seelke R., and Togoda H., Specific DNA-Binding Protein and DNA Sequences Involved in Steroid Hormone Regulation of Gene Expression, In: cap.23: 259-267
- 13.- Hokfelt T., Johansson O., Ljungdahl A, Lundberg J. M., & Schultzberg M., 1980, Peptidergic neurones, Nature, 284, 515-521
- 14.- Schotman P., Schrama L. H., and Edwards P. M., Peptidergic Systems, In: vol

- 15.- Ramsdell J. S., and Tashjian. A. H. Jr., 1985, Thyrotropin-Releasing Hormone and Epidermal Growth Factor Stimulate Prolactin Synthesis by a Pathway(s) that Differs from that Used by Phorbol Esters: Dissociation of Actions by Calcium Dependency and Additivity, *Endocrinology*, 117, 2050-2060
- 16.- Freneau R. T., Lundblad J. R. Jr., Pritchett D. B., Wilcox J. N., Roberts J. L., 1986, Regulation of Pro-opiomelanocortin gene transcription in individual cell nuclei, *Science*, 234, 1265-11269.
- 17.- Isaacs R. E., Gardner D. G., and Baxter J. d., 1987, Insulin Regulation of Rat Growth Hormone Gene Expression, *Endocrinology*, 120, 2022-2028.
- 18.- Smith A. I. and Funder J. W., 1988, Proopiomelanocortin Processing in the Pituitary, Central System, and Peripheral Tissues, *Endocrine Reviews*, 9: 1, 159-179.
- 19.- Roberts J. L., Eberwine J. H., and Gee C. E., 1983, Analysis of POMC Gene Expression by Transcription Assay and In situ Hybridization Histochemistry, In: *Molecular Neurobiology XLVIII Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, eds. Cold Spring Harbor Laboratory.
- 20.- Affolter H. U. and Reisine T., 1985, Corticotropin Releasing Factor Increases Proopiomelanocortin Messenger RNA in Mouse Anterior Pituitary Tumor Cells, *J. Biol. Chem.*, 260; 29, 15477-15481.
- 21.- Jingami H., Matsukura S., Numa S., and Imura H., 1985, Effects of Adrenalectomy and Dexamethasone Administration on the Level of Prepro-Corticotropin-Releasing Factor Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) in the Hypothalamus and Adrenocorticotropin/ B-Lipotropin precursor mRNA in the Pituitary in rats, *Endocrinology*, 117, 1314-1320.
- 22.- Israel A., and Cohen S. N, 1985, Hormonally Mediated Negative Regulation of Human Pro-Opimelanocortin Gene Expression after Transfection into Mouse L Cells, *Mol. Cell. Biol*, 5; 9, 2443-2453.
- 23.- Chen C. L. C., Dionne F. T., Roberts J. L., 1983, Regulation of the Poopimelanocortin mRNA Levels in Rat Pituitary by Dopaminergic Comound, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80 : 2211- 2214.
- 24.- Cote T. E., Felder R., Keabian J. W., Sakura R. D., Reisine T., and Affolter H. U., 1986, D-2 Dopamine Receptor-mediated Inhibition of Pro-opiomelanocortin Synthesis in Rat Intermediate lobe, *J. Biol. Chem.*, 261; 10, 4555-4561.
- 25.- Cote T. E., Grewe C. W., Tsudruta K., Stoof J. C., Eskay R. L., and Keabian J. W., 1982, *Endocrinology*, 110, 805-811.

- 26.- Antakly T., Marcille S., Cote J. P., 1987, regulation specific dopaminergic regulation of the glucocorticoid receptor in the rat pituitary, *Endocrinology*, 120 : 1558- 1562
- 27.- Shull J. D., and Gorski J., 1985, Estrogen Regulates the Transcription of the Rat Prolactin Gene in vivo through at Least Two Independent Mechanisms, *Endocrinology*, 116, 2456-2462.
- 29.- Laverriere J. N., Müller M., Buisson N., Tougaard C., Tixier-Vidal A., Martial J. A., and Gourdjji D., 1986, Differential Implications of Deoxyribonucleic Acid Methylation in Rat Prolactin and Rat Growth Hormone Gene Expressions: A Comparison between Rat Pituitary cell Strain, *Endocrinology*, 118, 198-206.
- 30.- Yaffe G. M., Samuels H. H., 1984, Hormonal Regulation of the Growth Hormone Gene, *J. Biol. Chem.*, 259, 6284
- 31.- Glass C. K., Franco R., Weinberger C., Albert V. R., Evans R. M., Rosenfeld M. G., 1987, A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone, *Nature*, 229(22) : 738-741.
- 32.- Jantsen H-M., Strahle U., Gloss B., Stewart F., Schmid W., Boshart M., Miksicek R., and Schütz G., 1987, Cooperativity of Glucocorticoid Response Elements Located Far Upstream of the Tyrosine Aminotransferase Gen, *Cell*, 49 : 29-38
- 33.- Wilcox J. N., and Roberts J. I., 1985, Estrogen Decrease Rat Hypothalamic Proopiomelanocortin Messenger Ribonucleic Acid Levels, *Endocrinology*, 117, 2392-2396.
- 34.- Lewis E. J., Tank A. W., Weiner N., and Chikaraishi D. M., 1983, Regulation of Tyrosine Hydroxylase mRNA by Glucocorticoid and Cyclic AMP in a Rat Pheocromocytoma Cell Line, *J. Biol. Chem.*, 258, 14632-14637
- 35.- Nair R. M. G., Barrett J. F., Bowers C. Y., and Schally V., 1970, Structure of Porcine Thyrotropin Releasing Hormone, *Biochemistry*, 9, 1103-1106.
- 36.- Burgus R., Dunn T. F., Desidero L., Ward D. N, Vale L., and Guillemin R., 1970, Characterization of the hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor (TRF) of bovine origin, *Nature*, 226 : 231-235
- 37.- Jackson I. M. D., Lechan R. M., 1983, Thyrotropin Releasing Hormone, In: *Brain Peptides* (D. Krieger, M. Brownstein, J. Martin, eds.), John Wiley & Sons, INC. New York, 664-670.
- 38.- Jackson I. M. D., and Lechan R. M., 1987, Thyretropin Releasing Hormone, In: *Brain Peptides Update*, (J. B. Martin, M.J. Brownstein, D. T. Krieger , eds.) vol 1, John Wiley & Sons, 105-107.

- 39.- Lechan R. M., Wu P., Jackson I.M.D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G., Goodman R. H., 1986, Thyrotropin-Releasing Hormone Precursors: Characterization in rat brain, *Science*, 231 : 159-161.
- 40.- Segerson T. P., Hoefler H., Childers H., Wolfe H. J., Wu P., Jackson I. M. D., and Lechan R., 1987, Localization of Thyrotropin-releasing hormone Prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by *in situ* hybridization, *Endocrinology*, 121, 98-107.
- 41.- Jackson I. M. D., and Lechan R. M., 1987 Thyrotropin releasing hormone, In: *Brain Peptides Update* (J. B. Martin, M. J. Brownstein, D. T. Krieger, eds.) vol. 1, John Wiley & Sons, 107-108.
- 42.- Horst W. D., Spirt N., and Bautz G., 1979, Influence of Thyrotropin-Releasing Hormone on the Synaptic availability of Catecholamines in Brain. In: *Central Nervous System Effects of Hypothalamic Hormones and Other Peptides* (R. Collvet al, eds) Raven Press, New York, 141-143.
- 43.- Kerwin R. W. and Pycock C. J., 1979, Thyrotropin Releasing Hormone Stimulates Release of H-dopamine from Slices of Rat Nucleus Accumbens In Vitro, *Br. J. Pharmacol.*, 67, 323-325.
- 44.- Cohn M. L., Amirkhanian J., Wooten D. J., Cohn M., Bush R. and Moreno J., 1982, Thyrotropin Releasing Hormone: A possible Mechanism of Action in Thermoregulation, *5TH Symp. Pharmacol. Thermoregulation*, Saint-Paul de vence, 113-116.
- 45.- Andrews J. S. and Sahgal A., 1983, The effects of Thyrotropin-releasing Hormone Metabolites and Analogues on Locomotor Activity in Rats, *Regulatory Peptides*, 7, 97-109.
- 46.- Garat B., Miranda J., Charli J. L. and Joseph-Bravo P., 1985, Presence of a Membrane Bound Pyroglutamyl Amino Peptidase Degrading Thyrotropin Releasing Hormone in Rat Brain, *Neuropeptides*, 6, 461-469.
- 47.- Taylor W. L. and Dixon J. E., 1978, Characterization of a Pyroglutamate Aminopeptidase from Rat Serum that Degrades Thyrotropin-Releasing Hormone, *J. Biol. Chem.*, 253, 6934-6940.
- 48.- Prasad C. and Peterkofsky A., 1976, Demonstration of Pyroglutamyl Peptidase and Amidase Activities toward Thyrotropin Releasing Hormone in Hamster hypothalamus Extracts, *J. Biol. Chem.*, 251, 3229-3234.
- 49.- Orłowski M., Wilk E., Pearce S. and Wilk S., 1979, Purification and Properties of a Prolyl Endopeptidase from Rabbit, *J. Neurochem.*, 33 : 461-469
- 50.- Ponce G., Charli J. L., Pasten J. A., Aceves C. and Joseph-Bravo P., Tissue Specific Regulation of Pyroglutamate Aminopeptidase II Activity by Thyroid Hormones, *Neuroendocrinology*, in Press.

- 51.- Guillemin R., Yamazaki E., Gard D. A., Jutisz M., and Sakis E., 1963, In vitro Secretion of Thyrotropin (TSH): Stimulation by a Hypothalamic Peptide (TRF), *Endocrinology*, 73, 564-572.
- 52.- Aizawa T. and Greer M. A., 1981, Delineation of the Hypothalamic Area Controlling Thyrotropin Secretion in the Rat, *Endocrinology*, 109, 1731-1738.
- 53.- Gershengorn M. C. and Paul M. E., 1986, Evidence for Tight Coupling of Receptor Occupancy by Thyrotropin-Releasing Hormone to Phospholipase C Mediated Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Pituitary Cell: Use of Clonidine as a Competitive Antagonist, *Endocrinology*, 119, 833-839.
- 54.- Laverrier J. N., Tixier-vidal A., Buisson N., Morin A., Martial J. A. and Gourdjji D., 1988, Preferential Role of Calcium in the Regulation of Prolactin Gene Transcription by Thyrotropin-Releasing Hormone in GH3 Pituitary Cells, *Endocrinology*, 122(1).
- 55.- Morley J. E., 1981, Neuroendocrine Control of Thyrotropin Secretion, *Endocrinology*, 2, 396-436.
- 56.- Vale W., Rivier C., Brazeau P. and Guillemin R., 1974, Effects of Somatostatin on the Secretion of Thyrotropin and Prolactin, *Endocrinology*, 95, 968-975
- 57.- Arimura A. and Schally A. V., 1976, Increase in Basal and Thyrotropin Releasing Hormone Stimulated Secretion of Thyrotropin by Passive Immunization with Antiserum to Somatostatin, *Endocrinology*, 98, 1069-1073
- 58.- Taylor T., Scouten CH. W., Jacobowitz D. M., and Weintraub B. D., 1986, The Effects of Anterior Hypothalamic Deafferentation on Thyrotropin (TSH) Biosynthesis and Response to TSH-releasing Hormone, *Endocrinology*, 118, 2417-2424.
- 59.- Lippman S. S., Amr S., Weintraub B. D., 1986, Discordant Effects of Thyrotropin(TSH)-Releasing Hormone on Pre-and Posttranslational Regulation of TSH Biosynthesis in Rat Pituitary, *Endocrinology*, 119, 343
- 60.- Taylor T., Gesundheit N., Gyves P. W., Jacobowitz D. M. and Weintraub B. D., 1988, Hypothalamic Hypothyroidism Caused by Lesions in Rat Paraventricular Nuclei Alters the Carbohydrate Structure of Secreted Thyrotropin, *Endocrinology*, 122, 283-290.
- 61.- Menezes-Ferreira M. M., Patrick P. A. and Weintraub B. D., 1986, Regulation of Thyrotropin (TSH) Bioactivity by TSH-Releasing Hormone and Thyroid Hormone, *Endocrinology*, 118, 2125-2130
- 62.- Hinkle P. M. and Tashjian A. H. Jr., 1975, Thyrotropin-Releasing Hormone Regulates the Number of Its Own Receptor in the GH3 Strain of Pituitary Cells in Culture, *Biochemistry*, 14, 3845-3851.

- 63.- Oron Y., Etraub R. E., Traktman P., Gershengorn M. C., 1987, Decreased TRH Receptor mRNA Activity Precedes Homologous downregulation: Assay in oocytes, *Science*, 238 : 1406-1408.
- 64.- Dumont J. E. and Lamy F., 1980, The Regulation of Thyroid Cell Metabolism, Function, Grow and Differentiation, *The Thyroid Gland (Comprehensive Endocrinology, Visscher M., Eds.)*, Raven Press, 153-162.
- 65.- Carr F. E., Ridgway E. C. and Chin W. W., 1985, Rapid Simultaneous Measurement of Rat and Thyrotropin (TSH) B-Subunit Messenger Ribonucleic Acids (mRNAs) by Solution Hybridization: Regulation of TSH Subunit mRNAs by Thyroid Hormones, *Endocrinology*, 117, 1272-1278.
- 66.- Ponce G., Charli J. L., Pasten J., Aceves C. and Joseph-Bravo P., Tissue Specific Regulation of Pyroglutamate Aminopeptidase II Activity by Thyroid Hormones, in press.
- 67.- Samuels H. H., Stanley F. and Shapirro L. E., Modulation of Thyroid Hormone Nuclear Receptor Levels by 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine en GH1 Cells, *J. Biol. Chem.*, 252, 6052-6060
- 68.- Gerendai I., Nemeskéri A., Faivre-Bauman A., Grouselle D. and Tixier-Vidal A., 1985, Effect of unilateral or bilateral thyroidectomy on TRH content of Hypothalamus halves, *J. Endocrinol. Invest.*, 8, 321-323
- 70.- Sinha D., and Meites J., 1966-1966, Effects of Thyroidectomy and Thyroxine on Hypothalamic Concentration of Thyrotropin Releasing Factor and Pituitary Content of Thyrotropin in Rats, *Neuroendocrinology*, 1, 4-14
- 70.- Roti E., Christianson D., Harris A., Braverman L. E. and Wagenakis A. G., 1978, *Endocrinology*, 103, 1162
- 71.- Andersson K., Eneroth P., 1987, Thyroidectomy and Central Catecholamine Neurons of Male rat, *Neuroendocrinology*, 45, 14-27.
- 72.- Bassiri R. M., and Utiguer R. D., 1984, *Endocrinology*, 94: 188
- 73.- Grosvenor C. E., Mena F. 1980, Evidence that Thyrotropin Releasing Hormone and a Hypothalamic Prolactin Releasing Factor May Funtion in The Release of Prolactin in the Lactating Rat, *Endocrinology*, 107, 863.
- 74.- Kis J. Z., Kanyicska B., and Nagy G., 1986, The Hypothalamic Paraventricular Nucleos Has a Pivotal Role in Regulation of Prolactin Release in Lactating Rats, *Endocrinology*, 119(2) : 870-873.
- 75.- Ben-Jonathan N., 1985, Dopamine: a prolactin inhibiting hormone.

Endocr. Rev., 6: 564.

- 76.- Abe H., Engler D., Molitch M. E., Bollinger N., Gruber J., Reichlin S., 1985, Vasoactive Intestinal Peptide Is a Physiological Mediator of Prolactin Release in the Rat. *Endocrinology*, 116, 1383
- 77.- Vale W., Backwell R., Grant G., Guillemin R., 1973, TRF and Thyroid hormones on prolactin secretion by rat anterior pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 93, 26
- 78.- Greef W. S., Voogt J. L., Visser T. J., Lamberts S. W. J., and Schoot P. V. D., 1987, Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology*, 316-322
- 79.- De Greef W. J., Plotsky P. M., Neil J. D., Dopamine level in Hypophysial stalk plasma and Prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology*, 32, 229-233
- 80.- Martino E., Bambini G., Bertalena L., Aghin-Lombardi F., Breccia M., Baschieri L. and Pinchera A., 1986, Ontogenia of Nyctoheral variations of thyrotropin releasing hormone in rat hypothalamus. *Endocrinology*, 119, 232-235.
- 81.- Jordan D., Perria F., Mornex R., 1986, Circannual variations of TSH circadian Rhythm parameters in the rat. *Neuroendocrinology*, 36, 17-20
- 84.- Montoya E., Seibel M. J., and Wilber J. F., 1975, Thyrotropin-releasing hormone secretory physiology: studies by radioimmunoassay and affinity chromatography. *Endocrinology*, 96,
- 85.- Emerson C. H., and Utiger R. D., Plasma Thyrotropin-releasing hormone concentrations in the rat (effect of thyroid excess and deficiency and cold exposure
- 86.- Lizardi P., 1983, Methods for preparation of messenger RNA. *Methods in Enzymology*, Academic Press, 96, 38-49
- 87.- Chirgwin J.M., Pizybyla A. E., McDonald R. J., and Rutter W. S., 1979, Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, 18, 5294-5299.
- 88.- Charli J. L., Mendez M., Joseph-Bravo P., and Wilk S., 1987, Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolidase do not change the in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9, 373-376
- 89.- Mori M., Yamada M., 1987, Thyroid hormones regulate the amount of thyrotrophin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. *J. endocr.*, 114, 443-448.

- 90.- Segerson T.P., Kaver J., Wolfe H. C., Moltaker H., Wu P., Jackson I.M.D., 1987, Thyroid Hormone Regulates TRH Biosynthesis in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus, *Science*, 238, 78-80
- 91.- Lee S. L., Stewart K., Roos B., Sevarino K., 1987, Characterization and expression of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone (TRH). Program of the 69th Annual Meeting of the Endocrine Society, Indianapolis, 224 (abstract).
- 92.- Rondeel J. M. M., De Grèef W. J., Van der Schoot P., Karels B., Klootwijk W. and Visser T. J., 1988, Effect of Thyroid Status and Paraventricular Area Lesions on the Release of Thyrotropin-Releasing Hormone and Catecholamines into Hypophysial Portal Blood, *Endocrinology*, 123, 523-527.
- 93.- Joseph-Bravo P., Mendez M., Vargas M. A., Cruz, C., Wilk S., and Charli J. L., 1987, Role de PGA I, PE, PGA II, in TRH metabolism in brain. Meeting of the International Society of Neurochemistry.
- 94.- Soeller R. T., Wolff R. S., Koller K. J., 1988, Thyroid hormone regulation of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin(TSH)-releasing hormone is independent of the pituitary gland and TSH, *Molecular Endocrinology*, 2, 248-252

ANEXO I

NEURONAL TRH SYNTHESIS: DEVELOPMENTAL AND CIRCADIAN TRH mRNA LEVELS

L. Covarrubias*, R.M. Uribe, M. Méndez, J.L. Charli and P. Joseph-Bravo

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, UNAM;
*Centro de Investigación en Reproducción Animal, CINVESTAV-IPN and
División de Estudios Especiales, Instituto Mexicano de Psiquiatría, México

Received December 23, 1987

SUMMARY: Peptide biosynthesis within a neuron involves several steps occurring at the soma and during its travel to the nerve terminal, where it accumulates to be released under stimulatory conditions. We have measured hypothalamic TRH and TRH mRNA during ontogeny and circadian cycle and observed that TRH mRNA variations are more prominent than TRH ones. On the basis of these results and in vitro release experiments, we propose a compensatory mechanism working at the nerve terminal which is activated after release. © 1988 Academic Press, Inc.

When a peptide is released in response to endogeneous or environmental stimuli, a mechanism for recovering the basal intracellular levels must exist. Although many complex regulatory processes might be involved, biosynthesis and/or intracellular degradation rate can play an important role. Several steps are involved in peptide biosynthesis where mRNA levels can be a limiting component. Peptide biosynthesis has been shown to be regulated at transcriptional level by the same effectors that stimulate release (1,2,3); for POMC, other steps such as posttranslational processing and peptide modifications are also affected (4,5).

TRH is a tripeptide with both endocrine and neural functions (for review see 6). The sequence for TRH precursor has been deduced from a cDNA clone (7) and TRH mode of degradation has also been studied (8,9,10). In this report, we focus on TRH and its specific mRNA levels in the hypothalamus in two different conditions, ontogeny (11) and circadian cycle (12), as an approach to study in vivo overall kinetics of TRH metabolism. Our data show evidence for a coupling between biosynthesis and release and gives insights for an intracellular compensatory mechanism.

MATERIALS AND METHODS: Male Wistar rats, fed ad libitum (Purina Chow) were maintained in a 12 h light-dark cycle (light on 6:00-18:00). All rats at each time were sacrificed within an hour and tissues were dissected and kept frozen (-70 °C) until assayed.

*Correspondence to: L. Covarrubias, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado Postal 510-3, Col. Miraval, Cuernavaca, Mor., 62270, MEXICO.

Each hypothalamus was homogenized in 200 μ l 50mM Tris-HCl pH 7.4, 25 mM NaCl, 5mM MgCl₂; 5 μ l of 25% Triton X-100 and 100 μ l of 72% saccharose were added and the homogenate centrifuged 10 min at 4°C; the supernatant (cytosolic fraction) where 100 μ l of 6% SDS, 0.4M NaCl, 40mM EDTA solution were added, was extracted 3x with phenol-chloroform (vol./vol); to the aqueous phase, 5M NaCl (1/25th of total vol.) and 2 vol. of ethanol were added and left at -70°C for 12 h to precipitate total RNA. RNA samples were verified on 1% agarose minigels (containing 2.2M formaldehyde, 10mM sodium phosphate buffer, pH 7).

TRH cDNA kindly donated by Dr. R. Goodman (7) was [³²P]-labeled by Nick Translation to 1-5x10⁸ cpm/ μ g specific activity. RNA samples were run in formaldehyde minigels and transferred to nitrocellulose paper. Hybridization was performed at 42°C in 5x SSC, 1x Denhart, 20mM sodium phosphate pH 6.5, 10% dextran sulphate and 50% formamide (13). Ribosomal RNA bands (stained with ethidium bromide) and TRH-mRNA autoradiographic band were quantified by densitometry in a Hoeffer scanning densitometer GS300. All data were measured within the linear range of detection.

TRH was quantified by specific radioimmunoassay according to Mendez et al (14).

RESULTS AND DISCUSSION

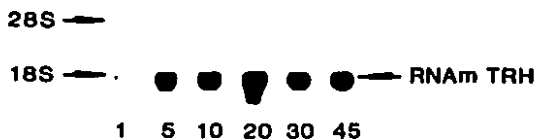
To determine whether TRH mRNA changes concomitantly with TRH levels within the hypothalamus, we measured both parameters during ontogeny (Fig. 1). TRH mRNA levels showed same increasing tendency as TRH within the first 20 days postnatal but, later in development, some differences were seen between TRH and TRH mRNA behaviour. Therefore, at least in part, TRH mRNA is responsible for TRH levels during ontogeny.

Several authors have reported the ontogenetic pattern of TRH content (11,15,16). Looking at curve pattern all reports are similar up to 20-30 days of age and differences are seen later in development; our results resemble those of Martino et al (11) and Gayo et al (15). These last authors have made an analogy in ontogenesis of TRH, TSH and thyroid hormones. Within the hypothalamus-hypophysis-thyroid axis variations in TRH mRNA levels can be due essentially to two processes: cellular development of hypothalamus, specifically TRH-ergic neurons, and negative feedback by thyroid hormones on TRH biosynthesis (17,18). The TRH mRNA fall on day 45 might be due to the accumulation of thyroid hormones at this period.

Although TRH role on TSH secretion is well documented, it is not clear how much secreted TRH is involved in other endocrine functions (e.g. prolactin secretion). Hypothalamic TRH can have other non-endocrine functions (e.g. neurotransmitter) from those TRH-ergic neurons which do not direct axons to the median eminence. Therefore, the pattern for TRH and TRH mRNA observed can be due to different physiological phenomena occurring in the developing rat (e.g. circadian rhythm maturation, puberty) as well as different regulatory mechanisms working in each group of neurons involved. Microdissection of hypothalamic nuclei will help to get a more homogeneous population of TRH-ergic neurons.

TRH release is a rapid event causing a depletion of intracellular TRH and

A



B

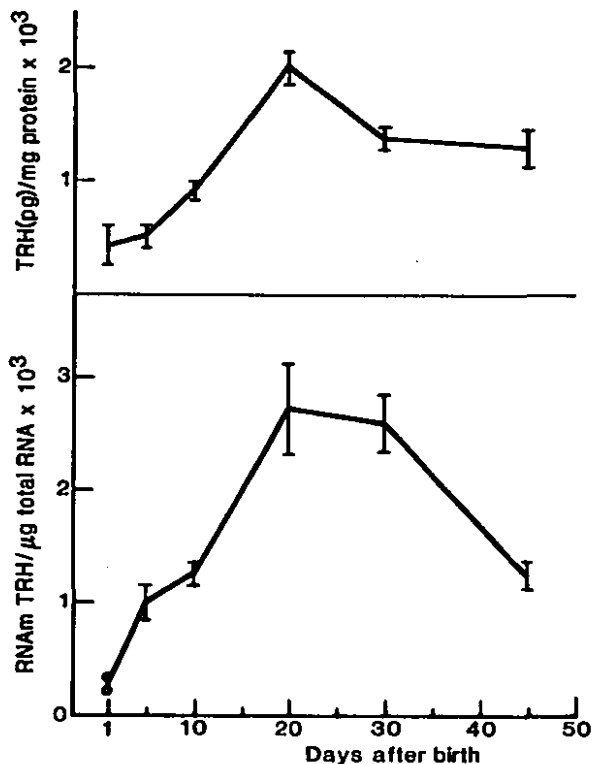


Fig. 1. TRH and TRH mRNA during ontogeny. Hypothalamic TRH and TRH mRNA were measured at different days after birth as indicated in Materials and Methods. (A) Autoradiography of representative RNA samples hybridized with TRH cDNA [³²P]-labeled; note that expected size (1.6 Kb) is seen at all ages. (B) TRH and TRH mRNA were normalized per mg of protein and µg of total RNA respectively. Each value is the mean ± SEM (n=3).

the need for a mechanism responsible for recovering basal levels. In order to study the role of mRNA on adjustment of hypothalamic TRH levels, we measured TRH mRNA together with TRH during circadian cycle (Fig. 2). The observed

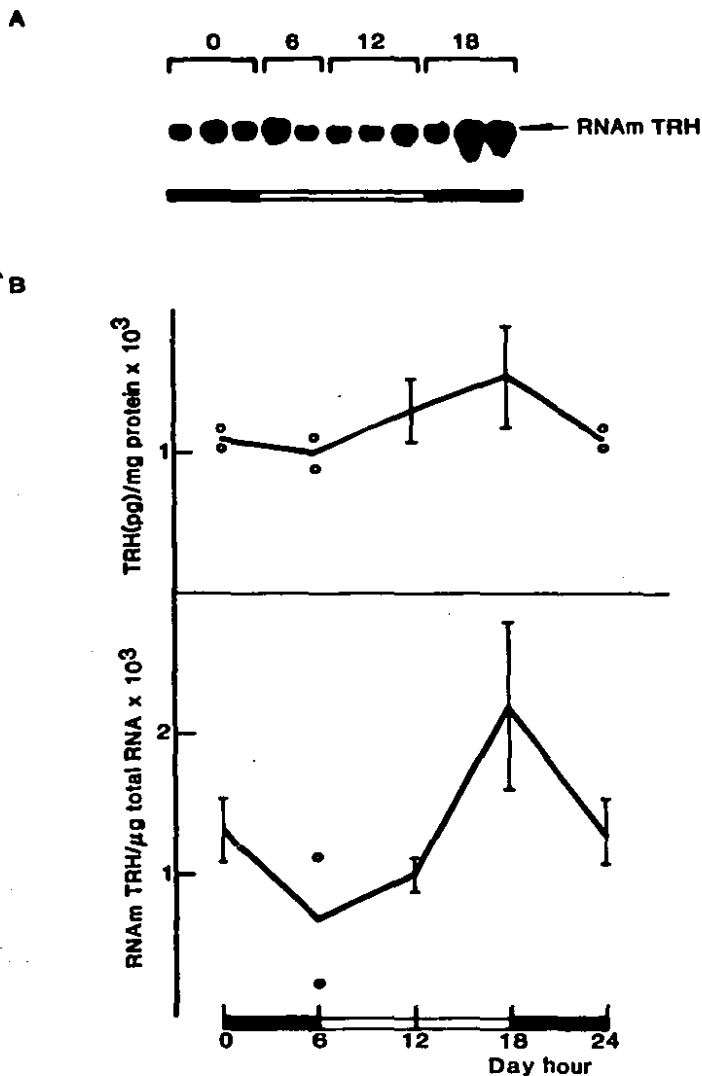


Fig. 2. TRH and TRH mRNA during circadian cycle. Hypothalamic TRH and TRH mRNA of adult rats were measured at different time of the day as indicated in Materials and Methods. (A) Autoradiography of RNA samples hybridized with TRH cDNA [³²P] labeled. (B) TRH and TRH mRNA were normalized per ug of protein and ug of total RNA respectively. Mean ± SEM (n=3).

circadian rhythm of TRH and its mRNA were similar in adult animals, with highest levels at 18 hrs. These results suggest that TRH release during light-dark cycle is closely coupled with TRH mRNA levels within the 24 hrs. period.

TRH circadian pattern observed is similar to the ones described before (12,19). TRH peak appears just before the activity period of rats and falls near its end. This result correlates well with TSH circadian rhythm, but as mentioned before, hypothalamic TRH is involved in other no well defined functions, some of which might have circadian cycles too. The well defined rhythm in the whole hypothalamus suggests that most of TRH-ergic cycling nuclei are synchronized; this hypothesis is supported by Kerdelhue's results (19) showing two hypothalamic areas with maximum values at around the same time.

Since we found fluctuations in TRH as well as TRH mRNA levels during circadian cycle, and Martino et al (12) have shown a developmental rise of TRH rhythm, we decided to analyze how much dependency exist between circadian rhythm and postnatal development for defining peptide and mRNA levels. Fig. 3 shows a variety of circadian patterns for TRH and TRH mRNA at different ages ranging from no fluctuations (TRH at 5 days) to more than one peak (TRH mRNA at 30 days). These data indicate that TRH and TRH mRNA levels depend on both postnatal development and circadian rhythm behaviour of TRH-ergic neurons; therefore, they are a combination of biological and physiological processes.

The development of TRH circadian rhythm which is attained only at adult stage, suggest that it is a consequence of multifactorial influences that only when all are achieved, it becomes synchronized. It is difficult, and would be to speculative to stress which of different (if no all) factors can affect (such as neuronal, hormonal- i.e. puberty-or behavioural).

TRH biosynthesis involves all steps of protein synthesis plus posttranslational processing and terminal modifications (pGlu formation and amidation). As shown, during ontogeny, between days 1 and 20 TRH mRNA increased 10 fold and TRH only 5 fold and, during circadian cycle, TRH mRNA increased 3x compared to the basal increase of TRH. These observations imply that although correlations exists between intracellular TRH and TRH mRNA in the phenomena described, compensatory mechanisms might also be involved in setting the final TRH levels.

Several steps could be regulated after transcription: mRNA stability, translation and posttranslational events. We have not established if changes in mRNA levels observed are due to the transcription process itself or mRNA stability; direct measurement of transcription rate will define which process dominate mRNA levels in our conditions. On the other hand, experiments should

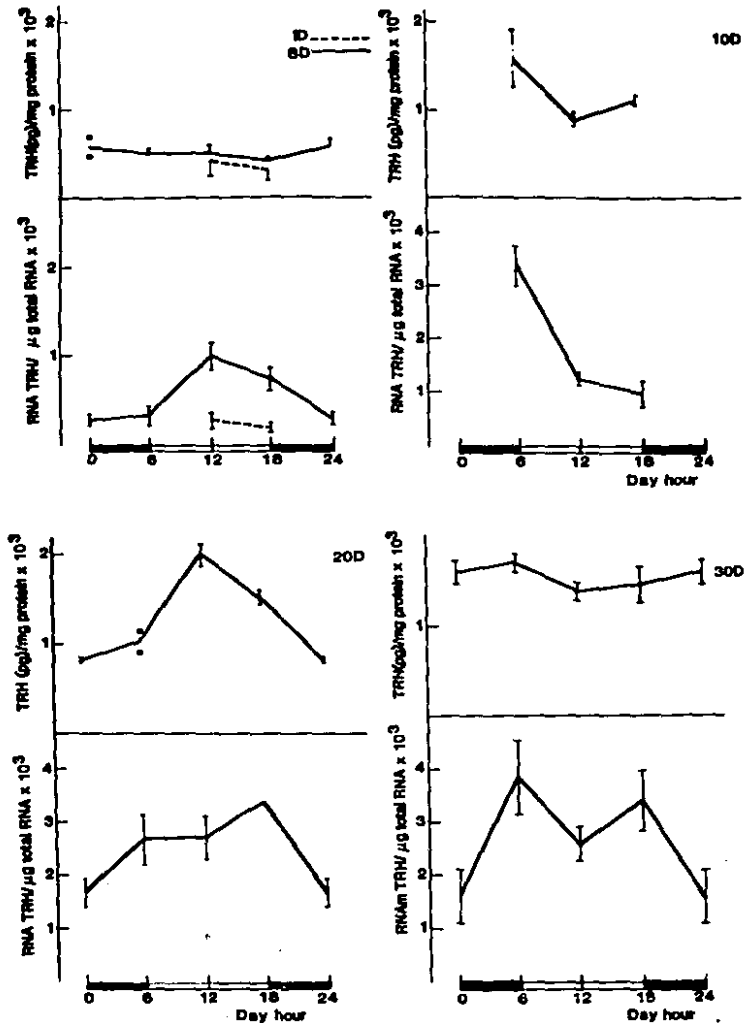


Fig. 3. Development of circadian TRH and TRH mRNA variations. Circadian TRH and TRH mRNA variations were measured at different days after birth. Observe that in most cases TRH and TRH mRNA peaks occur at the same time. Mean \pm SEM (n=3).

be addressed to estimate the regulatory role of translation and postranslational events in this system.

We do not know when release is occurring in the two phenomena analyzed,

therefore, synthesis and release might not be directly coupled. Direct measure of in vivo release is experimentally difficult; however, bare TRH variations during circadian cycle suggest active release at time of synthesis. Accordingly, a recent report (17) and our own observations (18) show that TRH mRNA of paraventricular nucleus (containing most TRH-ergic neurons sending axons to the median eminence) or whole hypothalamus increases in hypothyroid rats whereas median eminence TRH remains unchanged (20).

In addition we observed in in vitro experiments, performed as described (14), that TRH content in hypothalamus or e.g. cervical part of spinal chord do not change despite release. Mean \pm SEM percentage of TRH tissue content released in 60min (hypothalamus) or 70 min (cervical part of spinal chord), including a 10 min stimulation period with 56mM KCl, were $9.9 \pm 1.8\%$ (n= 8) and $47.8 \pm 4.9\%$ (n= 6) respectively. We suspect now that TRH released levels are underestimated due to degradation by pyroglutamate amino peptidase II activity which is 5-fold higher in hypothalamic than spinal chord membranes (21). This suggests that at least ~50% of total initial content is released after 60 or 70 min incubation from either tissue and therefore a biosynthetic process at the nerve terminal might be coupled to release, i.e. amidation reaction that forms TRH from pglu-his-pro-gly and is activated by ascorbic acid (22); the enzymes involved, could be regulated as reported for MSH acetylation (5). Regulation of intracellular degradation seems unlikely since inhibition of the two soluble intracellular degrading enzymes do not affect endogeneous TRH (23) nor thyroid hormone status affect degrading enzyme activity at hypothalamic level (24). Segerson et al have postulated that other active peptides could be synthesized from the same TRH-precursor (25). Although this might also explain our results since a proportion of TRH mRNA measured could give rise to other active peptides and be regulated differentially, this hypothesis still is speculative.

In conclusion, we propose a regulatory mechanism responsible of establishing TRH levels at nerve terminal working actively after release.

ACKNOWLEDGMENTS We would like to thank Dr. R.H. Goodman for providing us with his TRH cDNA clone, the technical assistance of E. Mata and the typing by V. Aldama. This work was partially supported by CONACyT grants 1CSAXNA 030915 and PCEXCNA-051014.

REFERENCES

- 1.- Roberts, J.L., Eberwine, J.H. and Gee, C.E. (1985) *Synopsis on Quantitative Biology* Vol. XLIX, 385-391.
- 2.- Eiden, L.E., Giraud, P., Dave, J.R., Hotchkiss, A.J. and Affolter, H.-U. (1984) *Nature* 312, 661-663.
- 3.- Shupnik, M.A., Greenspan, S.L. and Ridgway, E.C. (1986) *J. Biol. Chem.* 261- 12675-12679.
- 4.- Shiomi, H., Watson, S.J., Kelsey, J.E. and Akil, H. (1986) *Endocrinology* 119, 1793-1799.

- 5.- Millington, W.R., O'Donohue, T.L., Chappell, M.C., Roberts, J.L. and Mueller, G.P. (1986) *Endocrinology* 118, 2024-2033.
- 6.- Prasad, C. (1985) In: *Handbook of Neurochemistry* (Lajtha, A. ed.) Vol. 8. Plenum Publishing Corporation, New York, 175-200.
- 7.- Lechan, R.M., Wu, P., Jackson, I.M.D., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G. and Goodman, R.H. (1986) *Science* 231, 159-161.
- 8.- Bauer, K. and Kleinkauf, H. (1980) *Eur. J. Biochem.* 106, 107-117.
- 9.- Wilk, S. (1986) *Life Sciences* 39, 1487-1492.
- 10.- Garat, B., Miranda, J., Charli, J-L. and Joseph-Bravo P. (1985) *Neuropeptides* 6, 27-40.
- 11.- Martino, E., Seo, H., Lernmark, A. and Refetoff, S. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4345-4348.
- 12.- Martino, E., Bambini, G., Bartalena, L., Aghini-Lombardi, F., Breccia, M. Baschieri, L. and Pinchera, A. (1986) *Endocrinology* 119, 232-235.
- 13.- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 14.- Mendez, M., Joseph-Bravo, P., Cisneros, M., Vargas, M.A. and Charli J-L. (1987) *Peptides* 8, 291-298.
- 15.- Gayo, L., Bonet, B., Herranz, A.S., Iglesias, R., Toro, M.J. and Montoya E. (1986) *Acta Endocrinologica* 112, 7-11.
- 16.- Lamberton, R.P., Lechan, R.M. and Jackson, I.M.D. (1984) *Endocrinology* 115, 2400-2405.
- 17.- Segerson, T.P., Kauer, J., Wolfe, H.C., Moltaker, H., Wu, P., Jackson, I.M.D. and Lechan, R.M. (1987) *Science* 238, 78-80.
- 18.- Covarrubias, L., Uribe, R.M., Mendez, M., Charli, J-L. and Joseph-Bravo, P. (1987) In: *Recent Advances in the Biomedical Significance of Thyrotropin Releasing Hormone*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York (in press).
- 19.- Kerdelhue, B., Palkovits, M., Kertesz, M. and Reinberg, A. (1981) *Brain Research* 206, 405-413.
- 20.- Kardon, F., Marcus, R.J., Winokur, A. and Utiger, R.D. (1977) *Endocrinology* 100, 1604-1609.
- 21.- Vargas, M.A., Mendez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P. and Charli J-L. (1987) *Neuroscience Letters* 79, 311-314.
- 22.- Clembotski, C.C., Manaker, S., Winokur, A. and Gibson, T.R. (1986) *J. Neurosci.* 6, 1796-1802.
- 23.- Charli, J-L., Mendez, M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1987) *Neuropeptides* 9, 373-378.
- 24.- Ponce, G., Charli, J-L., Pasten, J., Aceves, C. and Joseph-Bravo, P. (1987).
- 25.- Segerson, T.P., Hoefler, H., Childers, H., Wolfe, H.J., Wu, P., Jackson, I.M.D. and Lechan (1987) *Endocrinology* 121, 98-107.