

03081
14
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología

Regulación del Metabolismo de TRH en Diferentes Condiciones
Fisiológicas de la Rata

Tesis

que para obtener el grado de
Doctor en Investigación Biomédica Básica

presenta

la M. en IBB. Rosa María Uribe Villegas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuernavaca, Morelos

Abril 1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

INDICE

ABREVIATURAS	2
ABSTRACT	3
RESUMEN	4
INTRODUCCION	5
Comunicación intercelular	5
Los neuropéptidos como moléculas de señal	10
Metabolismo de los neuropéptidos	12
¿Cómo se controla la transcripción de un gene específico?	16
Regulación de la biosíntesis de péptidos en respuesta a señales extracelulares	18
LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)	21
Estructura y distribución	21
Relevancia Fisiológica del TRH	22
Metabolismo del TRH	24
Regulación del Metabolismo del TRH	28
OBJETIVOS	36
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
MATERIALES Y METODOS	39
RESULTADOS	41
DISCUSION	60
CONCLUSIONES	80
ARTICULOS (anexos)	81
REFERENCIAS	83

ABREVIATURAS

AMPC	Adenosin monofosfato cíclico
AP1	Factor transcripcional formado por las proteínas jun-fos que reconoce la secuencia de genes regulados por esteres de forbol
AP/HA	Area preóptica/hipotálamo anterior
CREB	Proteína que se une al elemento CRE
CRE	Secuencia consenso de genes regulados por AMPC
DG	Diacil glicerol
EM	Eminencia Media
IP ₃	Inositol trifosfato
HMB	Hipotálamo medio basal
LHRH	Hormona liberadora de la hormona luteinizante
NPV	Núcleo Paraventricular
NH	Neurohipófisis
OX	Oxitocina
PAM	Peptidil glicil monooxigenasa
POMC	Proopiomelanocortina
PP II	Piroglutamato aminopeptidasa II
PRL	Prolactina
SNC	Sistema nervioso central
RER	Retículo endoplásmico rugoso
SP1	Factor transcripcional que se una a la caja GC
SRIF	Somatostatina
SRP	Proteína de reconocimiento del péptido señal
TH	Hormonas tiroideas
TSH	Tirotropina
TRH	Hormona liberadora de la tirotropina

RESUMEN

El sistema neuroendócrino juega un papel importante en el control homeostático de los organismos. Las neuronas peptidérgicas que forman parte de este sistema son capaces de integrar diferentes señales extracelulares que reflejan el estado metabólico del organismo, y en respuesta a dichos mensajes liberan a su vez otros mensajeros que hacen blanco en diferentes tipos celulares en la adenohipófisis.

Desde hace mucho tiempo se realiza un esfuerzo importante por entender como se afecta el metabolismo de las moléculas de señal que sintetizan las neuronas peptidérgicas. En este trabajo describimos como se modulan en las neuronas hipofisiotróficas y en las células blanco, algunas de las etapas del metabolismo del TRH en condiciones fisiológicas en las cuales previamente se había descrito la participación del TRH. Empleamos dos tipos de modelos: a) lactancia y ciclo estral, condiciones en las cuales no modificamos el estado fisiológico del animal; b) estrés por frío y succión controlada en madres lactantes, procedimientos experimentales que permitieron aplicar un estímulo agudo a los animales de experimentación.

Durante el ciclo estral de la rata determinamos que en el diestro, los niveles de ARNm de TRH en el hipotálamo son mayores con respecto a los otros días. Esto sugiere que en este modelo la biosíntesis y liberación de TRH no están acoplados debido a que la liberación de TRH es mayor en la tarde del proestro. Observamos también cambios en la actividad de la enzima membranal inactivadora del TRH (PP II) en la adenohipófisis, los que son en sentido opuesto al ARNm de TRH.

En el día 18 de la gestación, durante el periodo de lactancia y al destete observamos cambios importantes en el metabolismo del TRH en las neuronas del NPV del hipotálamo. En el día 18 de la gestación tanto el ARNm de TRH en el NPV así como el TRH en HMB se encontraban elevados; más tarde, en el primer día de la lactancia el ARNm no cambió mientras que el nivel del péptido disminuye de manera considerable. Esto sugiere que entre estas dos etapas ocurrió una liberación importante de TRH. La medición de éstos dos parámetros al día cinco de lactancia nos muestra que el ARNm disminuyó y que el TRH empieza a incrementarse a la par de un aumento en la concentración de PRL en suero. Posteriormente el ARNm se mantiene constante hasta el día 15 de la lactancia, mientras que el TRH y PRL siguen aumentando. Al destete no hubo cambio en el ARNm pero tanto el TRH como la PRL disminuyeron considerablemente. Los cambios observados en esta condición fisiológica sugieren que al final de la gestación e inicio de la lactancia la transcripción o eventos postranscripcionales se encuentran aumentados y que durante la lactancia la traducción o el procesamiento postraduccional son los que se modifican. Por otro lado, la succión aguda (controlada) indujo transitoriamente (30' de estímulo) un aumento en los niveles de ARNm y una disminución en el contenido de TRH en HMB y en la actividad de la enzima de suero que degrada al TRH.

La exposición al frío provocó una disminución momentánea del contenido de TRH del HMB; también se observó un incremento transitorio en el nivel de ARNm de TRH en el NPV. Los dos últimos modelos estudiados apoyan que los dos estímulos probados inducen liberación de TRH del HMB la cual está acoplada con aumento en la biosíntesis de TRH.

En conclusión, determinamos que diferentes etapas del metabolismo del TRH (biosíntesis, liberación y degradación) en las neuronas hipotalámicas y la adenohipófisis varían en las condiciones fisiológicas probadas; que estas modificaciones se manifiestan a corto y largo plazo y que probablemente neurotransmisores y hormonas son los responsables de los cambios.

INTRODUCCION

Comunicación intercelular.

El sistema neuroinmunoendócrino está integrado por diversos tipos celulares que reciben señales nerviosas u hormonales originadas tanto en el interior como exterior del organismo. Estas células a su vez, envían mensajes que hacen blanco en diferentes tipos celulares. La comunicación entre estas células es de gran importancia en el control homeostático del organismo.

Se han descrito varios tipos de comunicación intercelular (1,2). Las células que se encuentran estrechamente unidas se transmiten información por medio de las uniones comunicantes ("gap junctions"). Otro tipo de intercomunicación celular es la mediada por sustancias químicas como neurotransmisores, hormonas o factores de crecimiento. En este tipo de comunicación, las células liberan sus moléculas de señal al espacio extracelular de donde se movilizan hasta la célula blanco. En base a la distancia que necesita recorrer la molécula de señal se ha clasificado la comunicación química en tres clases. En la comunicación endócrina las moléculas de señal viajan grandes distancias a través del torrente sanguíneo hasta alcanzar su célula blanco. En la comunicación parácrina la molécula de señal hace blanco en una célula contigua al sitio de secreción; esto se observa por ejemplo en las sinápsis clásicas. Por último en la autócrina la molécula de señal actúa sobre la misma célula que la libera (Fig.1).

En las células blanco del mensaje existen proteínas denominadas receptores que reconocen de manera específica a las moléculas de señal o mensajeros químicos. Estas proteínas están acopladas o forman parte del sistema de transducción de las señales al

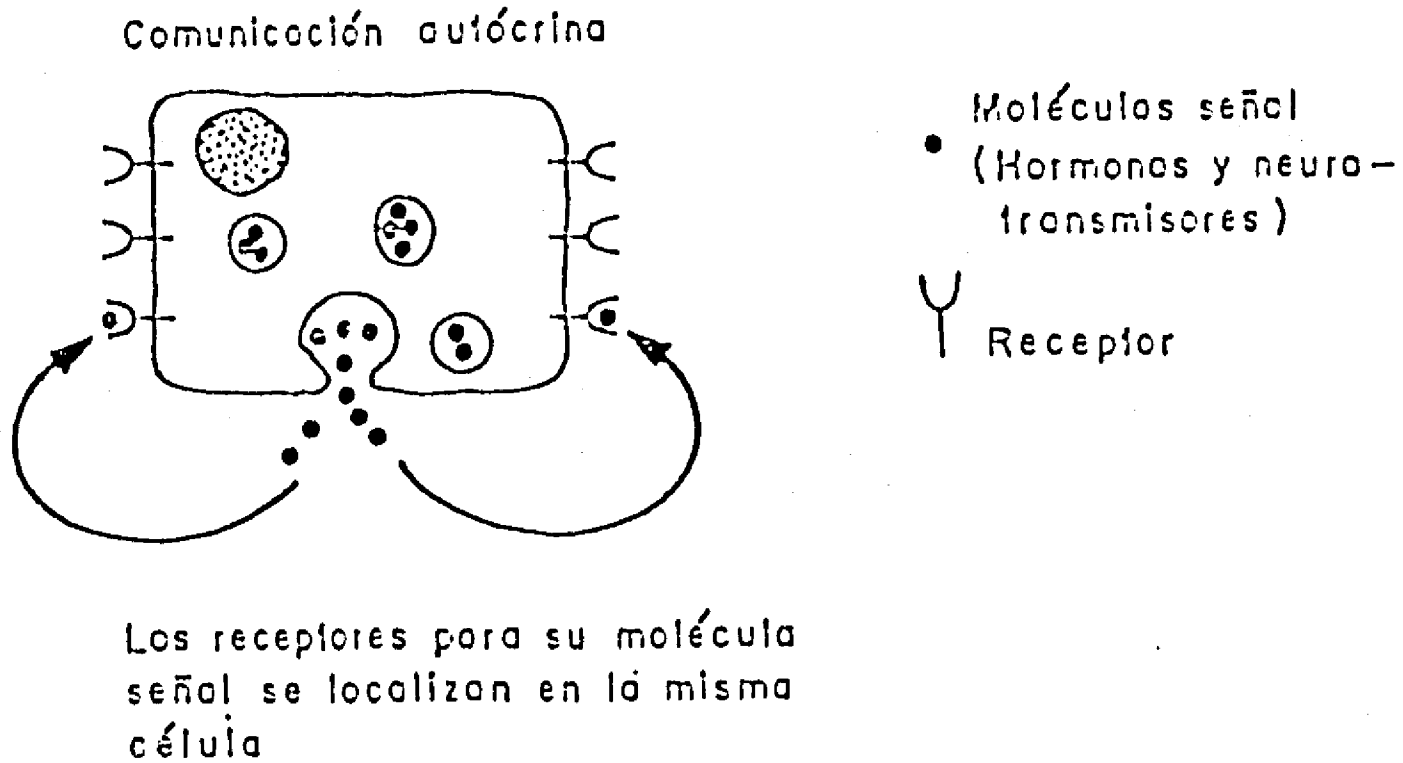
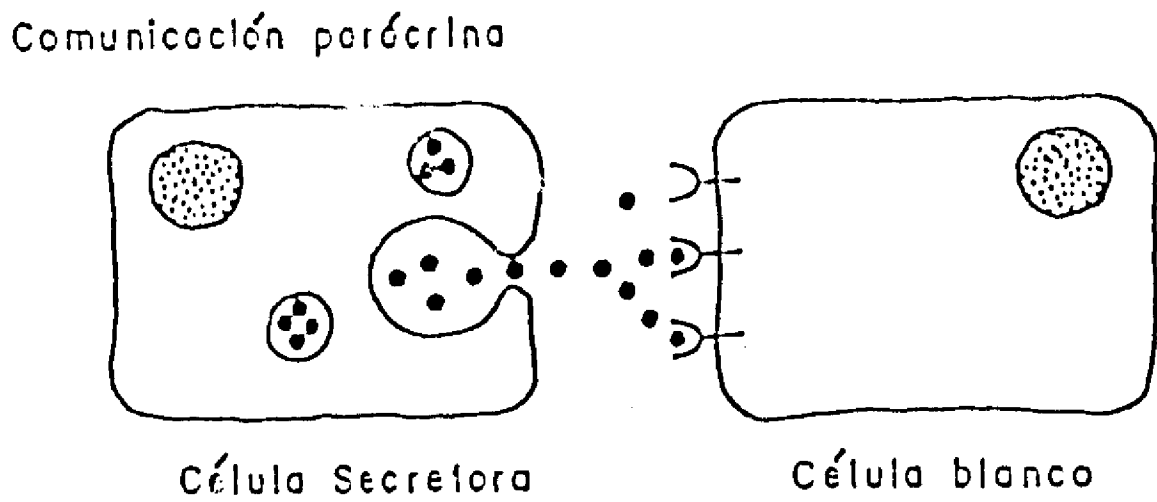
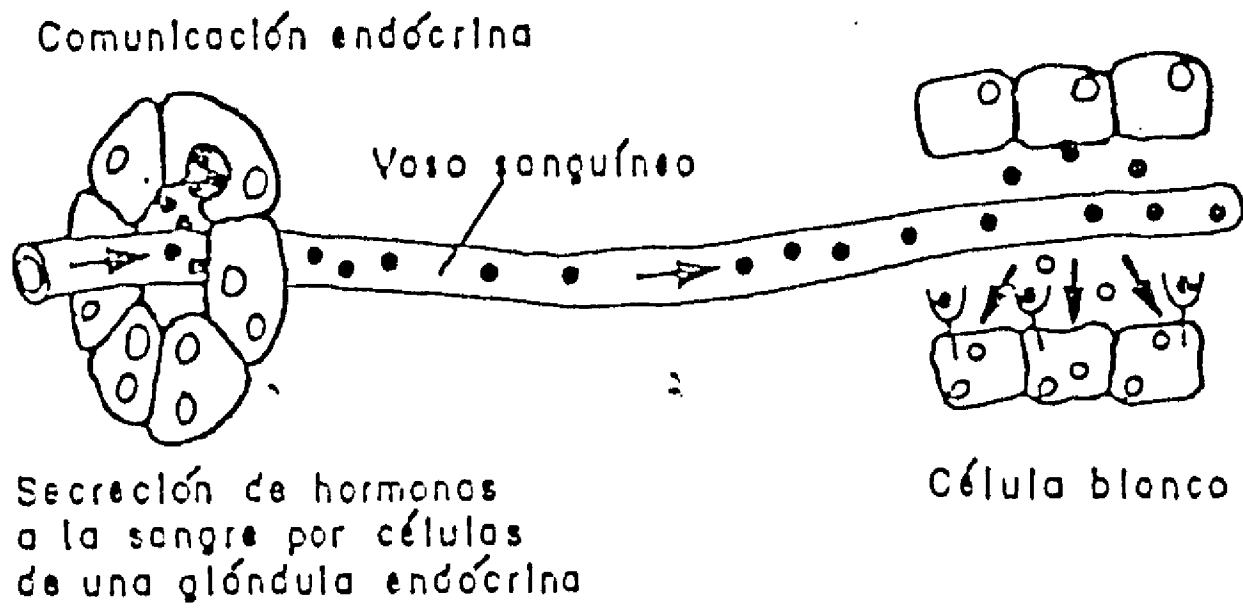


Figura 1

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

interior de la célula. Con la caracterización de un gran número de receptores se observó que muchos de ellos comparten características topológicas y bioquímicas. Topológicamente se pueden agrupar en receptores de las membranas plasmáticas y receptores intracelulares (citoplásmicos y/o nucleares).

Los receptores membranales (2) a su vez se han separado en familias como son: los receptores acoplados a proteínas G (p. ej. receptor β adrenérgico), receptores con actividad de cinasa (p. ej. receptor para insulina y factor de crecimiento epidérmico), y receptores que son canales iónicos (p. ej. receptores de acetil colina y GABA_A). La interacción de estos receptores con su molécula de señal, activa o inhibe una cascada de eventos que pueden inducir la producción de segundos mensajeros, la fosforilación de proteínas y/o la movilización de iones, entre otros eventos (Fig. 2). Esto puede traer en consecuencia cambios en el metabolismo de la célula y dependiendo de la función de esa célula en particular puede por ejemplo ocurrir la liberación de otras moléculas de señal, la síntesis de novo de proteínas, etc.

Los receptores intracelulares (3) se han agrupado en una sola familia integrada por los receptores para hormonas tiroideas, receptores de hormonas esteroideas y receptores del ácido retinóico. Estos receptores al unirse con su hormona pueden modular la actividad transcripcional de genes (Fig. 3).

Al igual que los receptores, a las moléculas de señal se les agrupó en familias en base a sus características químicas: a) las moléculas liposolubles integradas por las hormonas esteroideas, tiroideas, etc, que son acarreadas por proteínas del plasma hacia la célula blanco. Estas hormonas atraviesan la membrana citoplásmica para interaccionar con su receptor intracelular; b) las sustancias hidrosolubles comprenden a los neurotransmisores (como serotonina y dopamina), péptidos (como calcitonina y somatostatina), hormonas protéicas (p. ej. insulina y glucagon) y factores de crecimiento (p. ej. factor de crecimiento neuronal y factor de crecimiento plaquetario). Como ya se

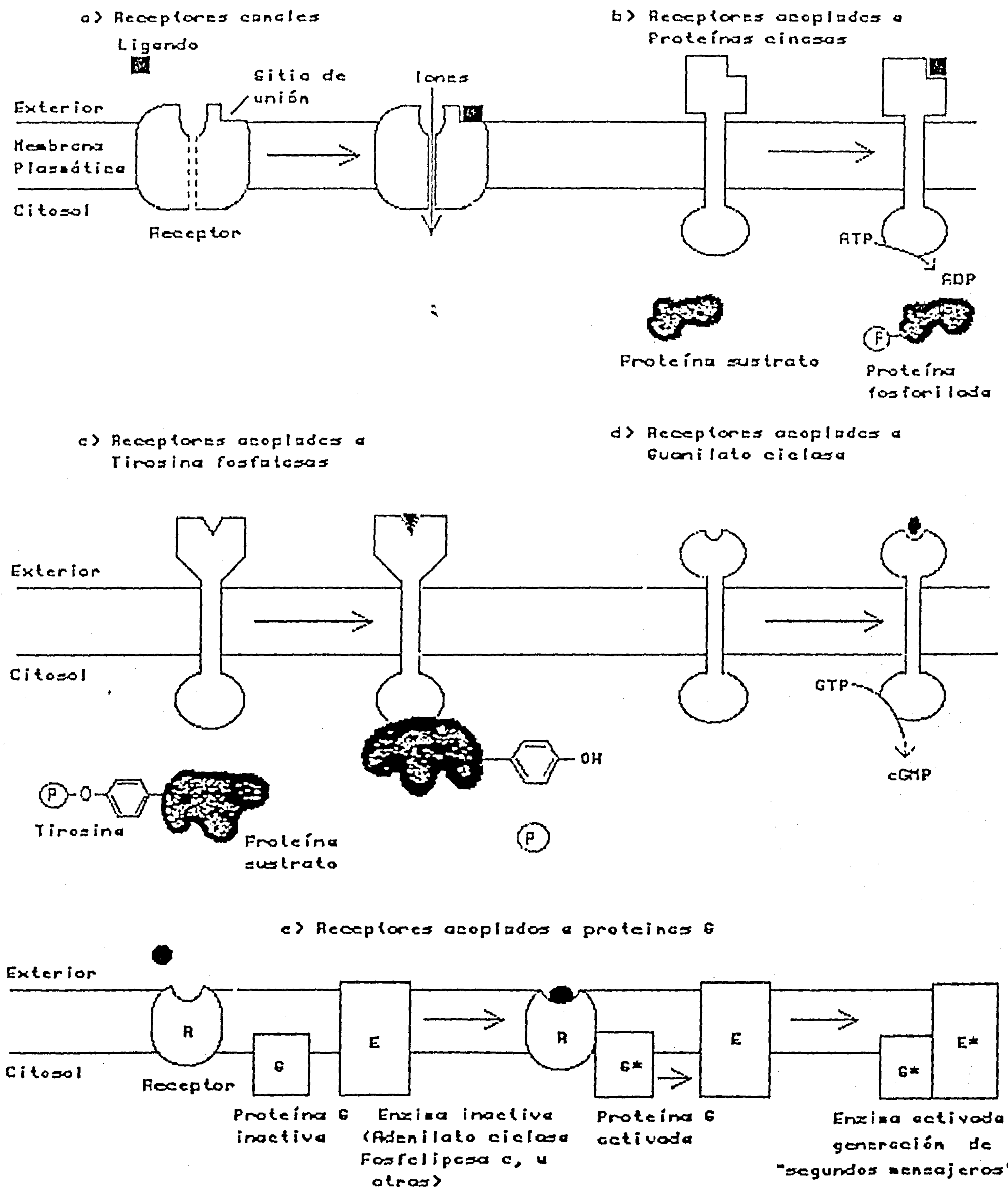


Figura 2

Representación de diferentes receptores de membrana plasmática.

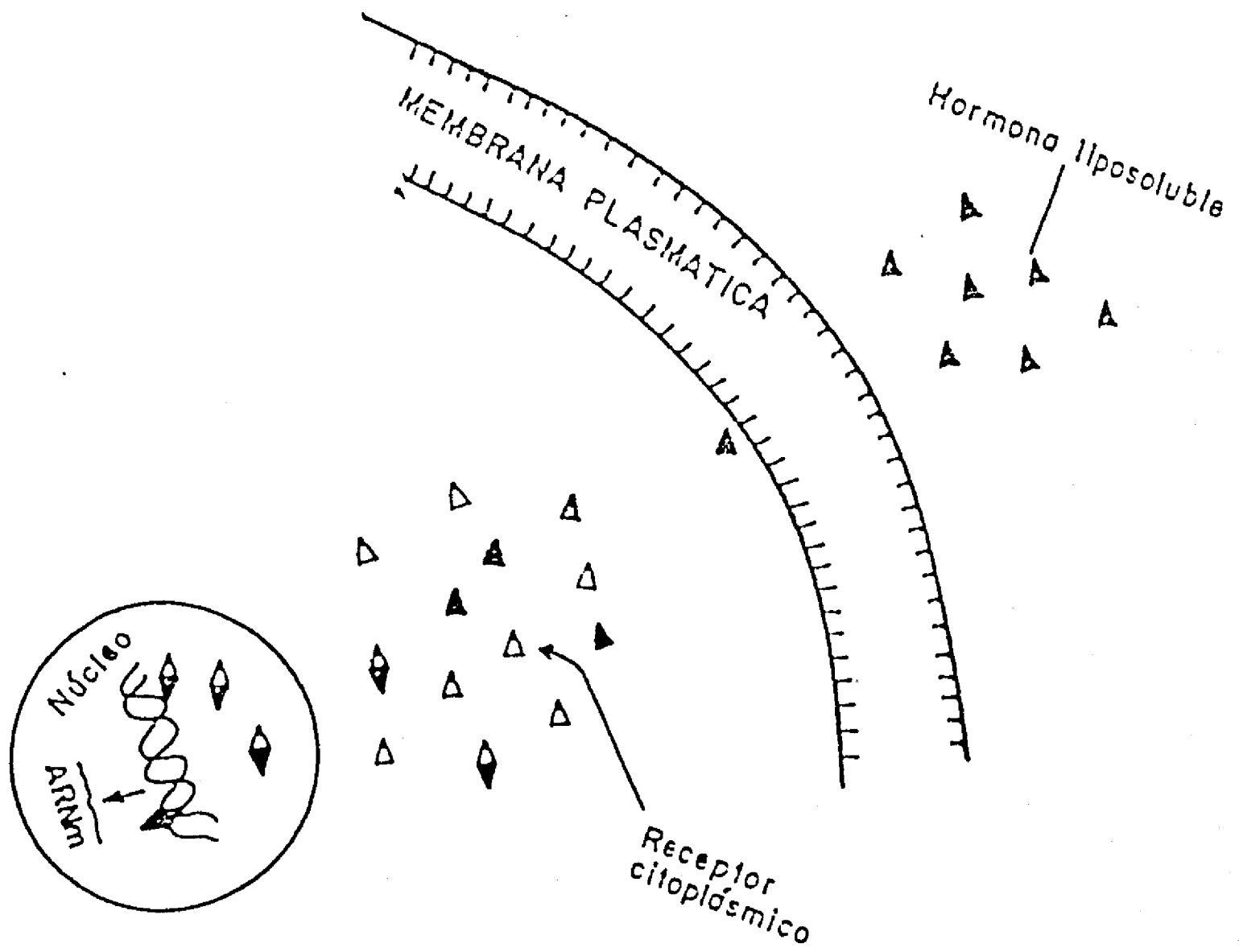


Figura 3

Esquemática de los receptores intracelulares y la interacción con su hormona.

mencionó, estas moléculas interaccionan con receptores localizados en la membrana plasmática para poder ejercer su acción sobre la célula blanco.

Los neuropéptidos como moléculas de señal.

Los neuropéptidos son moléculas que se identificaron primeramente en la neurohipófisis y en el hipotálamo de diversas especies. Muchas de estas sustancias fueron caracterizadas inicialmente por su capacidad estimuladora o inhibitoria sobre la liberación de las hormonas de la adenohipófisis. La hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento (somatostatina, SRIF) fueron de los primeros péptidos caracterizados en el hipotálamo (4). Se purificaron además otros péptidos que no estaban involucrados en la liberación de las hormonas adenohipofisiarias como la vasopresina, sustancia P y las encefalinas. Posteriormente se han aislado otros péptidos y además se observó que los péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central (SNC) lo que ha llevado a postularlos como neurotransmisores o neuromoduladores. También se les ha identificado en órganos periféricos. El conjunto de datos obtenidos sobre su distribución, metabolismo y efectos demostró que constituyen una clase extensa de mensajeros químicos participando en una multiplicidad de funciones en el organismo.

Estudios sobre su biosíntesis permitieron determinar que se sintetizan vía ribosomal a partir de precursores de alto peso molecular. Se han caracterizado varios tipos de precursores peptídicos los cuales pueden contener la información para uno o varios péptidos, por ejemplo el precursor de la LHRH contiene dos péptidos con actividad biológica diferentes (5), el precursor proopiomelanocortina (POMC) (6), que en su

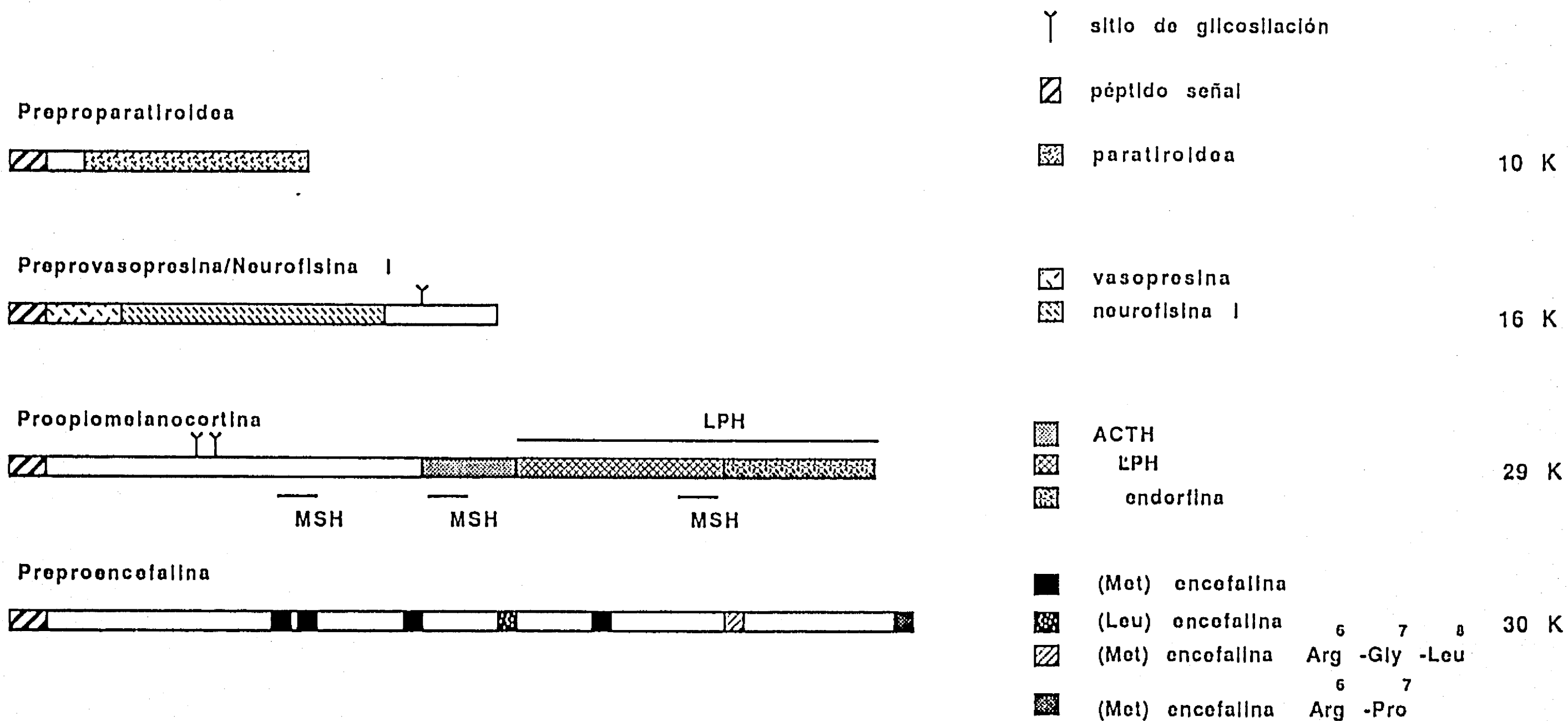


Figura 4

Precursores de diferentes hormonas peptídicas

En la figura se muestran diferentes tipos de precursores, la barra que separa a cada uno de los péptidos dentro de cada precursor indica las señales de corte o aminoácidos básicos (Lys-Arg y/o Arg-Lys), y señala los sitios de glicosilación.

secuencia se localizan cuando menos cinco péptidos fisiológicamente diferentes (Fig. 4), y en otros casos como el precursor del TRH se encuentra la información para varias copias del péptido activo (7). Los precursores presentan algunas características similares: contienen en el extremo amino terminal una secuencia señal como ocurre con proteínas que van a ser secretadas y generalmente los péptidos activos dentro del precursor están delimitados por pares de aminoácidos básicos. En años recientes ha crecido el interés por determinar las etapas del metabolismo de los neuropéptidos que se regulan en la célula en respuesta a señales extracelulares.

Metabolismo de los neuropéptidos.

Algunas etapas de la biosíntesis de éstos péptidos se realizan de manera similar a cualquier proteína secretada. La biosíntesis se inicia en el núcleo de la célula (Fig. 5) con la producción del ARN precursor por medio de la ARN polimerasa II. Este ARN precursor sufre varias modificaciones antes de salir del núcleo. En el extremo 5' se le añade un residuo de 7 metil guanosina y se metilan los primeros nucleótidos formando un casquete ("cap"). En el extremo 3' existe la señal de poliadenilación (AAUAAA), después de esta secuencia el ARN precursor se corta y se le añaden varias adeninas (cola de poly A). Otro evento importante es la eliminación de los intrones del ARN precursor por un proceso denominado "splicing". El ARN maduro (ARNm) es ahora transportado al citoplasma donde es traducido a un precursor denominado pre-pro-péptido por contener aún la secuencia señal. Los polipéptidos que van a ser secretados, tienen como característica general una secuencia rica en aminoácidos hidrofóbicos en su extremo amino terminal (péptido señal); esta secuencia se ha involucrado en el transporte del pre-pro-péptido al lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) (8). Existen varios reportes

que proponen un mecanismo para el transporte de la pre-pro-hormona al lumen del retículo endoplásmico. Se propone que poco después de haber sido sintetizado el péptido señal, se une a una ribonucleoproteína (SRP) formandose un complejo entre el péptido naciente, el ribosoma y SRP (9,10). Este complejo es dirigido a la membrana del RER por la interacción de SRP con un receptor específico; posteriormente el SRP y su receptor se separan de la unidad traduccional e inicia el proceso de transporte hacia el lumen del RER una vez que ocurre el corte del péptido señal (9). En el lumen del retículo endoplásmico, el propéptido (denominado así porque se eliminó la secuencia señal) puede sufrir modificaciones postraduccionales que principalmente son glicosilaciones. Mas tarde, el propéptido pasa al aparato de Golgi donde continua su procesamiento. En este compartimento, las glicosilaciones que ocurrieron en el RER se ramifican, y algunos aminoácidos son acetilados, fosforilados o sulfatados. En el Golgi, ocurre tambien la compartimentalización de los precursores en vesículas (Fig. 5). Este evento debe ser muy selectivo ya que se requiere que solo un subconjunto de proteínas esten en la misma vesícula (precursores y enzimas proteolíticas). Se ha observado que en el aparato de Golgi ocurren los primeros cortes proteolíticos que implican una compartimentalización diferencial de los péptidos contenidos en el precursor, o sea que en ciertos casos productos del procesamientos de un mismo precursor pueden tomar vias intracelulares distintas (11). En la vesícula generada en el aparato de Golgi finaliza el procesamiento que da lugar a los péptidos activos. Como ya se mencionó, los péptidos estan delimitados por pares de aminoácidos básicos y éstos son liberados del precursor por cortes proteolíticos que ocurren en ambos extremos. Algunas de las enzimas involucradas en dichos procesos se han caracterizado; presentan actividades similares a la tripsina y la carboxipeptidasa B (12). Los aminoácidos básicos del extremo carboxilo del péptido son eliminados por enzimas con actividad de carboxipeptidasa B, mientras que el extremo amino del péptido es generado por enzimas con actividad similar a la de

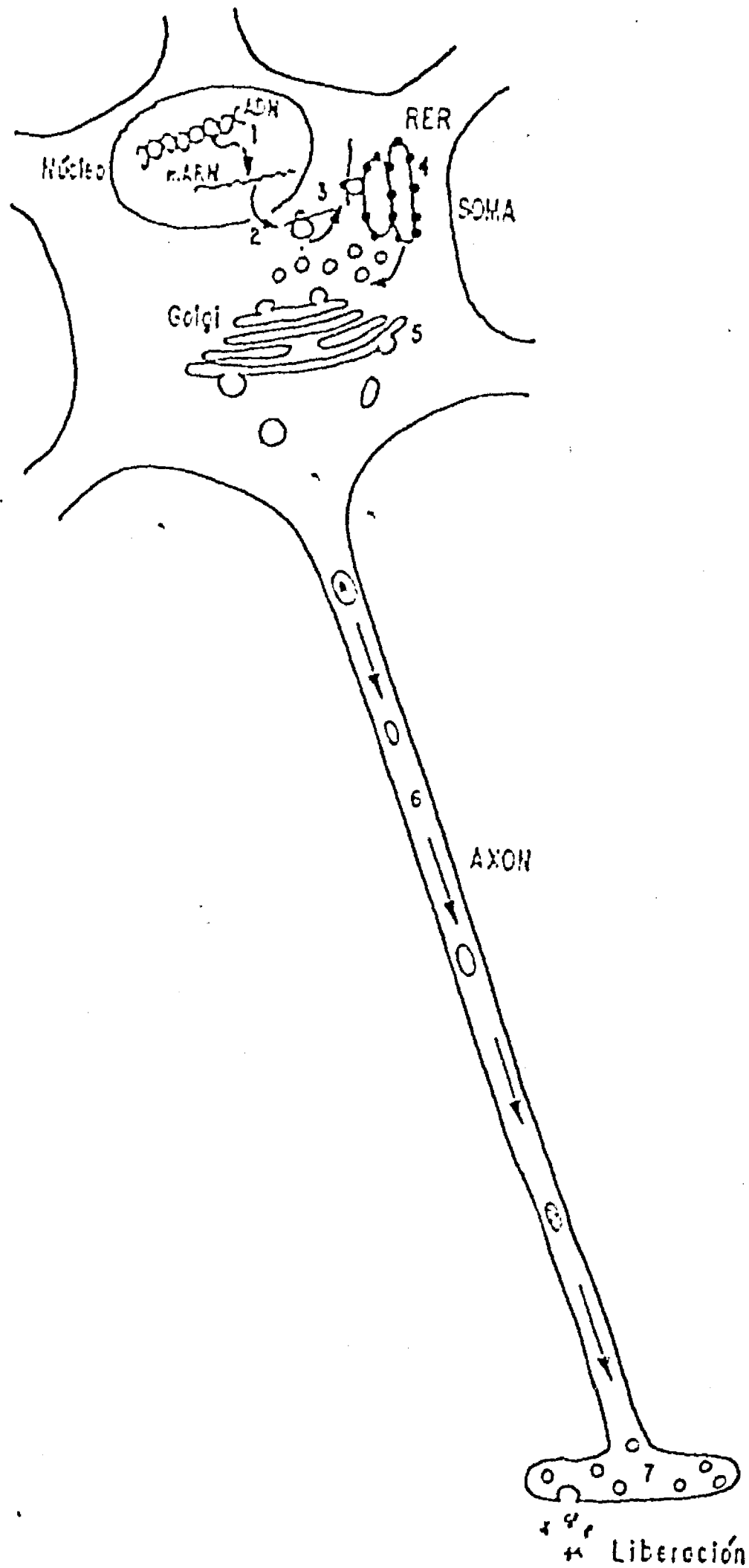


Figura 5

Esquemmatización de las etapas metabólicas que sigue un péptidos en una célula neuronal.

1. Transcripción y procesamiento del ARNm; 2. transporte del ARNm del núcleo al citoplasma; 3. traducción; 4. procesamientos del prepropéptido en el retículo endoplásmico rugoso; 5. modificaciones postraduccionales e inicio del procesamiento del propéptido en el aparato de Golgi; 6. transporte y procesamiento del propéptido; 7. almacenamiento del péptido activo.

tripsina. Muchos de los péptidos liberados del precursor requieren ser modificados en su extremo amino y/o carboxilo ya sea para tener actividad biológica o para ser inactivados. Por ejemplo, la LHRH y el TRH tienen la glutamina aminoterminal ciclizada, formando el grupo piroglutamil y además, tienen su aminoácido carboxilo terminal amidado. Las enzimas responsables de las modificaciones de los extremos son una glutamil ciclasa (13) para la ciclización y una peptidil glicil α monooxigenasa para la amidación (14).

El péptido ya procesado se mantiene en las vesículas, las cuales se almacenan en la terminal nerviosa, para el caso de neuropéptidos, hasta el momento de ser liberados o degradados. La liberación de péptidos se realiza por un mecanismo de exocitosis, el cual involucra la fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática. Este evento es disparado por un aumento en la concentración de Ca^{++} intracelular. Se han propuesto varios mecanismos que pudieran explicar la liberación de péptidos por exocitosis (15). Uno de los modelos propone que las vesículas en la terminal nerviosa están atrapadas en una red protéica, la cual se disocia en presencia de Ca^{++} y permite que las vesículas se fusionen con la membrana presináptica (16).

Los péptidos que son liberados al espacio extracelular son eliminados de este compartimento por difusión o degradación por proteasas. La eliminación de estos péptidos se ha propuesto como un mecanismo para finalizar la acción de una sustancia activa como mensajero. La acción de algunos de los neurotransmisores clásicos (dopamina o serotonina p. ej.) es rápidamente terminada por captura celular, mientras que para los péptidos este mecanismo no parece ser importante (17). Para estos últimos existen enzimas (específicas o inespecíficas) capaces de degradarlos (p. ej. encefalinasa, prolil endopeptidasa y piroglutamato aminopeptidasa membranal) (18). Las enzimas caracterizadas hasta ahora se han encontrado en tres compartimentos distintos: citoplásmicas, membranales o en fluidos extracelulares. Se han identificado diferentes tipos de enzimas de acuerdo a su localización, especificidad, etc, que son capaces de

degradar a los péptidos, y actualmente se realizan estudios para determinar la relevancia fisiológica de los diferentes tipos de enzimas en la inactivación de los neuropéptidos. Para las enzimas solubles es difícil entender su acceso al sustrato, dado que la mayor concentración del péptido intracelular se encuentra en vesículas. También se ha demostrado que si éstas son inhibidas, el contenido intracelular de un péptido, en particular TRH, se mantiene constante (19). Por otro lado, las enzimas membranales localizadas en la cara externa de la membrana plasmática y las enzimas que se encuentran en los fluidos extracelulares pueden limitar la concentración local del péptido alrededor de la célula blanco. Es probable entonces, que este tipo de enzimas sean más relevantes en la inactivación extracelular de los neuropéptidos (20).

¿Cómo se controla la transcripción de un gene específico?

En párrafos anteriores se dijo que las moléculas de señal al interaccionar con sus receptores pueden modificar la síntesis de proteínas específicas. Recientemente se han realizado muchos estudios enfocados en determinar como se regula la expresión de los genes en respuesta a una señal.

En la secuencia nucleotídica de los genes se han identificado regiones específicas involucradas en su expresión, las cuales se pueden dividir en dos tipos: región promotora y regiones regulatorias. Dentro de la región promotora se ha descrito a la caja TATA la cual parece determinar el sitio de iniciación de la transcripción y se encuentra localizada alrededor de 30 pares de nucleótidos (pn) antes del mismo (21,22); la caja CAT (CCAAT) y la caja GC (GGGCGGG) se encuentran localizadas hacia el extremo 5' de la caja TATA y están involucradas en la transcripción constitutiva de los genes. Las regiones regulatorias también llamadas "enhancers" se han relacionado principalmente

con la regulación de la tasa de transcripción de un gene; son secuencias entre 8-12 pb que en muchos casos incrementan fuertemente la transcripción de los genes cuando interactúa dicha secuencia con un factor de transcripción específico, su acción puede ser independiente de su orientación, distancia y posición con respecto a la caja TATA. Actualmente es difícil diferenciar claramente entre los elementos "enhancers" y los elementos de la región promotora puesto que parecen tener una actividad sinérgica en la regulación de la transcripción génica. Estas regiones son reconocidas de manera específica por proteínas que se encuentran en el citoplasma o núcleo de la célula (21,23). Algunas de estas proteínas interactúan con su secuencia de ADN en respuesta directa a una señal extracelular, como ocurre para los receptores intracelulares (24). Otros factores transcripcionales responden a cambios en los niveles de segundos mensajeros (25). Así, CREB (proteína que reconoce al elemento involucrado en modular la transcripción en respuesta a cambios en AMPc) reconoce una secuencia de ADN específica (llamada CRE) en respuesta a incrementos en los niveles de AMPc intracelular, y AP1 (complejo formado por los productos de los oncogenes cjun y cfos) se une a una secuencia específica en el ADN en respuesta a la activación de la ruta de inositol trifosfato-diacil glicerol. La regulación transcripcional de un gene específico en respuesta a una señal extracelular específica implica la existencia de los factores transcripcionales apropiados en la célula y la cantidad disponible o activa de estos factores puede ser regulada tanto a nivel de su síntesis, como por modificaciones postraduccionales o secuestro (25). Por ejemplo, cambios en la concentración de 17 β estradiol modulan a nivel transcripcional el número de sus propios receptores (26). La estimulación del receptor de acetil colina en las células PC12 aumenta los niveles del ARNm de la proteína fos (27), mientras que tratamientos con dexametasona (agonista del receptor de glucocorticoides) inhiben la transcripción de fos en otros tipos celulares (28). A nivel postraduccionales, la fosforilación de CREB por proteínas cinasas dependientes de

AMPC favorece la formación del dímero, el cual es la forma activa de este factor (29). En el caso de SP1, factor de transcripción que reconoce la caja GC, se ha visto que el bloqueo de sus glicosilaciones inhibe su capacidad de activar la transcripción (25). Un ejemplo de regulación por secuestro se ha descrito para el receptor de glucocorticoides. Se sabe que el receptor se encuentra unido a la proteína HSP90 (esta proteína fué primeramente identificada como una de las proteínas que se expresan en respuesta a un choque térmico o "heat shock") y solo es liberado en presencia de la hormona (30).

Respecto al mecanismo de activación transcripcional, no es claro aún si los factores transcripcionales interaccionan con el complejo de iniciación de la transcripción o bien con una proteína que sirve de enlace entre el factor y el complejo transcripcional. Sin embargo, en general la activación transcripcional involucra interacciones proteína-proteína. Al respecto, se han identificado dentro de los factores transcripcionales diferentes regiones (ricas en aminoácidos ácidos o prolinas o glutaminas) involucradas en el incremento de la transcripción (21).

Regulación de la biosíntesis de péptidos en respuesta a señales extracelulares.

A nivel de la biosíntesis de los péptidos, existen varias etapas que pueden ser regulables: transcripción, procesamiento posttranscripcional ("splicing", edición del ARNm), transporte del ARNm del núcleo al citoplasma, estabilidad del ARNm, traducción y procesamiento postraduccional.

El uso de técnicas de biología molecular permitió comprobar que la transcripción de los genes esta generalmente sometida a una regulación estricta en respuesta a cambios hormonales o locales. Los primeros estudios consistieron en demostrar cambios en la concentración de ARNm en respuesta a diferentes señales extracelulares. Por ejemplo,

deficiencia en glucocorticoides o estradiol en plasma induce en neuronas del hipotálamo aumento en los niveles de ARNm de los precursores de CRF (31) y de POMC (32), respectivamente. Mas tarde, empleando ensayos in vitro se demostraron que cambios en los niveles de ARNm correlacionaban con cambios en la actividad transcripcional. A este respecto, la despolarización de las células de la médula adrenal aumenta la transcripción del gene de encefalinas en éstas (33). Además, la adrenalectomía produce un aumento de la transcripción del gene de POMC en la hipófisis (34).

Dentro de las diferentes etapas que pueden ser regulables, podemos citar la edición del ARN. En los mamíferos solo se ha descrito un ARN que puede ser editado. Este ARN codifica para la apolipoproteína B que se sintetiza en el intestino delgado de la rata. La edición ocurre en un nucleótido en el cual se cambia un residuo de citosina por un residuo de uridina generandose con esta modificación un nuevo codón de terminación interno. La traducción del ARNm editado produce una proteína mas pequeña (apolipoproteína B48) que se expresa en hígado. Esta modificación esta regulada en el hígado por hormonas tiroideas: se ha determinado que las hormonas tiroideas aumentan la cantidad de la apolipoproteína B48 (35), pero hasta el momento no se conoce cual es el mecanismo por el cual dichas hormonas pueden estimular la edición del ARN.

Otra etapa biosintética que puede ser regulada, es el procesamiento o "splicing" del ARN precursor. Este mecanismo se ha empleado para generar diversidad de proteínas o péptidos a partir de un mismo gene y se ha estudiado ampliamente en la síntesis de inmunoglobulinas (36). Se ha observado claramente que el splicing se regula en un proceso de estres celular denominado "heat shock". En este modelo, cuando las células se exponen a temperaturas altas se incrementa la síntesis de ciertas proteínas llamadas proteínas de "heat shock". Bajo esta condición de estres, entre otras cosas el procesamiento de los ARNs de estas proteínas es mayor con respecto a las proteínas normales de la célula (37).

También se ha descrito que eventos postnucleares son regulados. Cambios en la estabilidad de diferentes ARNm han sido postulados en respuesta a cambios hormonales. En el caso de las encefalinas, se ha sugerido que ocurren cambios en la estabilidad del ARNm en respuesta a variaciones en los niveles de estradiol y progesterona (38). Por otro lado, la deficiencia de hierro aumenta la vida media del ARNm del receptor de transferrina mientras que el ARNm para la ferritina se desestabiliza (39). En el caso de los ARNs mensajeros de ferritina y transferrina se han caracterizado proteínas que están involucradas en la estabilización del ARNm, estas proteínas se unen a ciertas regiones del ARNm impidiendo probablemente que las ARNasas lo degraden. Además de los factores intracelulares, otras modificaciones intracelulares modifican la vida media de ciertos ARNm, por ejemplo la despolimerización de la tubulina aumenta la degradación de su ARNm (39,40).

En la estabilización de los ARN mensajeros se ha propuesto la existencia de secuencias dentro del mensajero y de factores protéicos (como en los casos mencionados anteriormente) que son responsable del efecto de estabilización (39,41).

Existe también regulación a nivel traduccional. Cambios en los niveles de estrógenos incrementan la traducción de una proteína básica de mielina (42).

Como se mencionó anteriormente las modificaciones postraduccionales son importantes para definir la actividad de los péptidos. Existen evidencias de regulación a nivel postraduccionales. Se ha reportado modulación en la actividad de las enzimas que procesan a los péptidos o de los productos de la acción de estas enzimas en respuesta a señales que incrementan los segundos mensajeros, así como a señales hormonales (12, 43). Cambios en el ARNm de POMC en respuesta a glucocorticoides se correlacionan con variación en los niveles del ARNm de la PAM (12,43). Además, la actividad de esta enzima así como el ARNm de POMC aumentan en el lóbulo intermedio de la adenohipófisis por la administración de antagonistas dopaminérgicos (12). Cambios

en la acetilación de algunos productos de la POMC determinan la potencia de éstos. La hormona estimuladora de los melanocitos (α MSH) acetilada es más activa mientras que la acetilación de la β endorfina elimina completamente su actividad opiacea. En anfibios se ha observado cambios en la acetilación de la MSH durante la adaptación a la luz. Además, se ha observado que la dopamina disminuye la acetilación de éste péptido (44). Por otro lado, varias hormonas adenohipofisarias requieren estar glicosiladas para ser reconocidas por su receptor, para el caso de la tirotropina se ha observado que el TRH aumenta en la adenohipófisis la síntesis de las formas glicosiladas con respecto a las no glicosiladas de la TSH (45).

La regulación de las diferentes etapas de la biosíntesis de un péptido repercute directamente en su cantidad y por lo tanto en el tamaño de la poza liberable en respuesta a un estímulo. Este aspecto es muy importante para las células en las cuales es necesario mantener una concentración adecuada de sus moléculas de secreción.

LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)

Estructura y distribución.

En la búsqueda de las sustancias hipotalámicas responsables de controlar la liberación de las hormonas adenohipofisarias, el TRH fué el primer péptido aislado por los grupos de los Drs. Schally (46) y Guillemin (47). El TRH es un tripéptido de estructura pglu-his-proNH₂, que se encuentra en el hipotálamo de muchas especies. Las técnicas de radioinmunoensayo, inmunohistoquímica e hibridación "in situ" han permitido determinar la distribución del TRH, su precursor y su ARNm específico, en el sistema nervioso central (SNC) y otros órganos. En el cerebro se han localizado somas en

diferentes regiones que incluyen el hipotálamo (en particular, núcleos paraventricular (NPV), preóptico, supraquiasmático, dorsomedial y porción posterior del arcuato), los lóbulos olfatorios, el núcleo comisural anterior, la sustancia gris periaqueductal, el rafe (núcleos dorsal, magnus pallidus y obscuro), la región peripiramidal y periolivar y el núcleo reticularis del tálamo (48,49). Las terminales nerviosas que contienen al TRH se han localizado en el hipotálamo (núcleos paraventricular, dorsomedial, supraquiasmático y en la eminencia media), los lóbulos olfatorios, el núcleo acumbens, el tallo cerebral, la médula espinal y la glándula pineal (50). Se han caracterizado algunas vías TRHérgicas: una proyecta de la región parvocelular del NPV hasta la eminencia media, y otra de los núcleos del rafe al asta dorsal de la médula espinal (50).

También se ha identificado TRH en órganos como el páncreas, la placenta, la próstata, las glándulas suprarrenales, la tiroides y el aparato gastrointestinal (50), así como el ARNm específico en el páncreas y tiroides (51,52).

Relevancia fisiológica del TRH.

La actividad biológica del TRH en las diferentes regiones del organismo es muy amplia. Se le ha descrito como neurohormona, neuromodulador y como factor parácrino.

Su papel como neurohormona hipofisiotrópica es el más estudiado. Su acción como neurohormona es ejercida sobre las células de la adenohipófisis. Para que esto ocurra es necesario que el TRH sea liberado de la eminencia media a la sangre portal de donde es transportado a la glándula. En dichas células el TRH induce la liberación de TSH in vivo e in vitro. La destrucción del NPV del hipotálamo disminuye la concentración de TSH en sangre periférica. Además de liberar a la TSH del tirotrópo, estimula la síntesis y la glicosilación de las subunidades α y β de la TSH (45,53). Se ha observado que bajo

condiciones de estrés como la exposición al frío la liberación de TRH de la eminencia media, aumenta en sangre portal, y que este incremento es responsable de la liberación de TSH a la sangre (54,55). El TRH también tiene actividad sobre los lactotrópos en donde induce la síntesis y liberación de la PRL (56,57). Se postula al TRH como un factor liberador de PRL en condiciones fisiológicas como la succión y el proestro donde el incremento de PRL en plasma se correlaciona con un aumento en los niveles de TRH en sangre portal (58,59). Además, ensayos de inmunización pasiva con anticuerpos anti-TRH previenen el aumento de la concentración de PRL que se produce en respuesta al estímulo de la succión y en la tarde del proestro (60,61). Por otro lado, existen datos contradictorios que no han permitido definir claramente el papel del TRH en las condiciones fisiológicas antes mencionadas. Gran parte del problema es causado por el control multifactorial al que está sometido la liberación de PRL. Uno de los factores que controla importantemente la liberación de PRL es la dopamina (DA), que inhibe tónicamente la liberación de PRL. A este respecto se ha visto tanto in vivo como in vitro que el retiro momentáneo del tono dopaminérgico, potencia el efecto facilitador del TRH sobre la liberación de PRL (62,63).

Debido a su amplia distribución en el SNC (50), se ha propuesto al TRH como un posible neuromodulador y/o neurotransmisor. Varias evidencias apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, en la rata el TRH aumenta el recambio de catecolaminas (64), induce liberación de dopamina del núcleo acumbens (65), produce hipotermia (66) y afecta la actividad motora (67). Además, cumple con otros criterios establecidos para definir a una sustancia como neurotransmisor como son: está localizada en terminales nerviosas, se libera por despolarización de la terminal nerviosa de manera dependiente de Ca^{++} , se han identificado receptores específicos en diferentes regiones del SNC (68), y su efecto puede ser terminado por un sistema de degradación extracelular específico (20).

Se ha propuesto que el TRH que se localiza en los órganos periféricos participa en

varias actividades, pero no se ha definido claramente su papel fisiológico. En el sistema gastrointestinal se ha postulado que participa en la contractilidad del intestino, también que retarda la absorción de glucosa y xylosa, e inhibe la secreción de ácidos gástricos estimulada por pentagastrina (50). En la próstata, se le ha involucrado en la modulación de la actividad de la 5α reductasa. También se creó que participa en la diferenciación de las células basales en el epitelio secretor de la próstata (69). En el páncreas, se ha determinado que potencia la liberación de glucagon estimulada por arginina (50). Dado que en el páncreas existe somatostatina y debido a que el TRH en otros sistemas tiene un efecto opuesto al de ésta hormona, pudiera ser que el TRH tenga un papel antagónico en el control de las células secretoras de los islotes de Langerhans.

Metabolismo del TRH.

El metabolismo del TRH en la neurona peptidérgica se puede dividir en tres etapas: biosíntesis, liberación y degradación.

Biosíntesis.

Durante los primeros estudios realizados para determinar la ruta biosintética del TRH, se trató de caracterizar una posible actividad enzimática capaz de sintetizarlo. Este enfoque fué tomado debido a que el TRH es un tripeptido y por analogía con la síntesis enzimática de los dipéptidos carnosina (ala-his) y N-acetil aspartilglutamato, se pensó que su síntesis ocurriría por vía enzimática. Mas tarde, la clonación y secuenciación de una parte del ADNc (70) para el precursor del TRH en la piel de *Xenopus laevis* demostró que la síntesis de TRH se efectúa por vía ribosomal y através de un precursor de alto peso molecular. En éste precursor se identificaron cuatro copias de la molécula de TRH y varios péptidos intermedios. Posteriormente, en el *Xenopus* se identificaron dos ADNc que son diferentes al primero, y éstos precursores contienen siete copias de la molécula

de TRH (71). Debido a las diferencias en la secuencia nucleotídica y en el tamaño se sugiere que los ADNc provienen de dos genes diferentes, por lo que es posible la existencia de múltiples genes para TRH en el sapo. También se demostró la existencia de ARNm de diferentes tamaños (1000, 1500, 3000 nucleótidos). Los diferentes ARNm se expresan diferencialmente en el cerebro, los ojos y la piel del *Xenopus* adulto, así como en el cerebro y ojos del renacuajo (72). Poco tiempo después de que se aisló el fragmento del ADNc de *Xenopus laevis*, se identificó el ADNc para TRH en el hipotálamo de la rata (7), el cual contiene 5 moléculas de TRH en su secuencia (Fig. 6). En la rata solo se ha identificado un ARNm específico de aproximadamente 1600 nucleótidos que provienen de un gene comprendido en 2.6 kb (73). La estructura del gene aislado de la rata presenta tres exones interrumpidos por dos intrones; en el primer exón se localiza la región 5' no traducida, el segundo exón contiene al péptido señal y una pequeña parte de la región amino terminal y en el tercer exón se localizan las cinco copias de TRH, los péptidos intermedios y la región 3' no traducida. En la región regulatoria del gene de TRH se identificaron la caja TATA, una región rica en GC (GGGCGG) que es reconocida por el factor de transcripción SP1, y las secuencias reconocidas por los receptores de glucocorticoides y de hormonas tiroideas (73), así como la secuencia de control por ésteres de forbol (25).

La síntesis y el inicio del procesamiento del precursor de TRH ocurre en el soma neuronal. El procesamiento al péptido maduro continúa durante su trayecto a la terminal nerviosa. Existe interés por definir como ocurre el procesamiento del precursor, así como por determinar la actividad biológica de las formas extendida del TRH o de los péptidos intermedios. En diferentes regiones del SNC y en el páncreas de la rata se han encontrado formas extendidas tanto en el extremo carboxilo terminal como en ambos extremos, así como péptidos de alto peso molecular que incluyen a un péptido intermedio (74,75). También se ha detectado inmunoreactividad para algunos de los péptidos

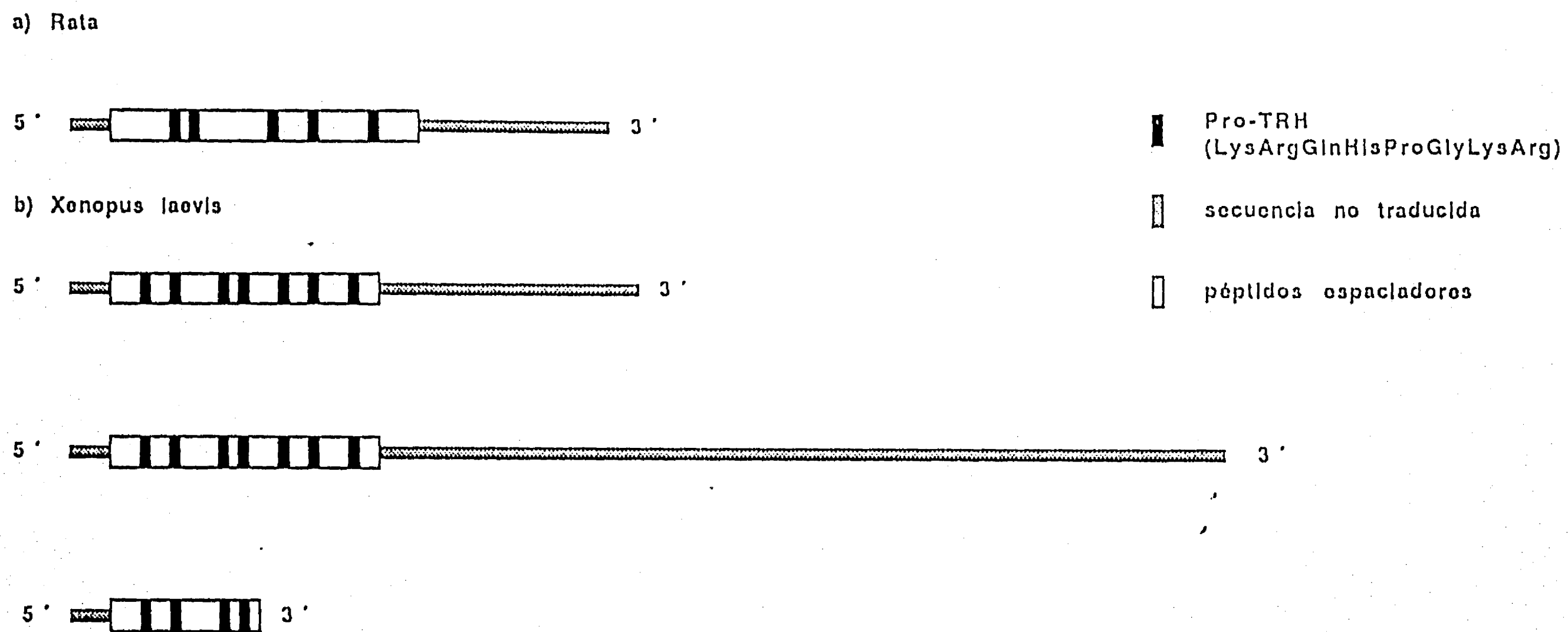


Figura 6

ARNm de los precursores del TRH en la rata y el *Xenopus laevis*.

El recuadro comprende las secuencias traducidas, las franjas negras dentro del recuadro indican la posición de la secuencia de aminoácidos que dan origen al TRH, las líneas gruesas representan las porciones no traducidas del ARNm. a) ARNm de TRH en el hipotálamo de la rata; b), c), d) y e) diferentes ARNm mensajeros de TRH aislados de la piel del *Xenopus laevis*.

intermedios en varias regiones que sintetizan al TRH, encontrándose con mayor frecuencia el péptido localizado entre las dos últimas moléculas de TRH de la parte amino terminal del precursor (76). Por otro lado, la relación de las formas extendidas, así como de los péptidos intermedios con respecto al péptido activo no es igual en todas las regiones donde se han detectado, lo que sugiere que el procesamiento del precursor de TRH es tejido específico (74,76). Hasta el momento solo se ha encontrado que el péptido intermedio localizado entre la tercera y cuarta copia del TRH puede tener un efecto biológico, ya que es liberado junto con el TRH de la eminencia media en respuesta a despolarización por K^+ y potencia la actividad del TRH sobre la liberación de TSH (77). Por lo que respecta a las formas extendidas no existen evidencias de una posible actividad; sin embargo, dado que existen formas extendidas de otros péptidos con actividad biológica, no se descarta que ocurriera lo mismo con las formas extendidas del TRH.

Liberación.

El péptido maduro almacenado en la terminal nerviosa, es liberado por despolarización de manera dependiente de Ca^{++} (78) como ocurre para los neurotransmisores clásicos. Estudios in vitro han sugerido que neurotransmisores como la noradrenalina, la serotonina y la histamina (79) son capaces de estimular la liberación de TRH del hipotálamo. Hemos sugerido que la liberación de TRH de neuronas hipotalámicas estimulada por despolarización con K^+ en presencia de Ca^{++} esta acoplada a incrementos en el procesamiento final del precursor en la terminal nerviosa (80). Esta etapa del procesamiento pudiera ser el último paso de la biosíntesis, la amidación del extremo carboxilo del TRH.

Degradación.

La inactivación de sustancias activas una vez que han sido liberadas al espacio extracelular ocurre mediante recaptura o degradación. Para el TRH se ha encontrado el mecanismo de recaptura pero dada su baja velocidad (V_{max}) no parece ser el mecanismo responsable de eliminar al TRH del espacio extracelular (17). Por otro lado la degradación de TRH puede efectuarse in vitro por dos grupos de actividades diferentes: eliminación del grupo piroglutamil del extremo amino o eliminación del grupo amido del extremo carboxilo. Para la primera actividad se han descrito tres enzimas. La piroglutamato aminopeptidasa II (PP II, ectoenzima membranal) y la tiroliberinas (enzima del suero) son metaloproteasas y presentan alta especificidad para el TRH (81,82). La piroglutamato aminopeptidasa I (PP I, enzima soluble) es una tiol proteasa soluble que corta cualquier enlace pglu-X (83). El segundo tipo de actividad enzimática esta dado por una endopeptidasa soluble que corta después de prolina: prolil-endopéptidasa (PE,(84)). Existen evidencias que apoyan que solo la PP II es responsable de inactivar al TRH en el espacio extracelular, p. ej, en ensayos in vitro con rebanadas de hipotálamo de rata es posible recuperar una mayor cantidad de TRH liberado en presencia de los inhibidores específicos de la PP II (20). Por otro lado, hasta el momento no se ha demostrado que las enzimas solubles puedan ser liberadas de la terminal nerviosa (19).

Regulación del metabolismo de TRH.

El metabolismo de TRH en la neurona TRHérgica se ve influenciado por señales internas y externas al organismo. Sin embargo hasta el momento no se han definido claramente cuales son los mecanismos y las señales específicas involucradas en el

control metabólico del TRH en el SNC.

En los primeros estudios sobre su regulación metabólica se trató de determinar si la liberación del TRH se modificaba en respuesta a cambios hormonales o ambientales. Un primer enfoque consistió en determinar el contenido de TRH en diferentes regiones del SNC, para lo que se implementaron técnicas de extracción del TRH de los tejidos y cuantificación por radioinmunoanálisis. Con este tipo de estrategia no se obtuvieron resultados concluyentes debido principalmente a que los niveles de TRH en el tejido reflejan el balance entre la biosíntesis y la liberación del péptido. Esto implica que los cambios en la tasa de secreción puede ser en ciertos casos compensados por variaciones en la síntesis (ver liberación en párrafos anteriores). En un segundo enfoque, se abordó la cuantificación de TRH liberado en fluidos biológicos in vivo. Mediciones de TRH por RIA de perfusados obtenidos de la eminencia media por perfusión "push-pull" han demostrado que el péptido se libera en respuesta a estrés por frío (54), lo que se había sugerido por medición del péptido en el tejido (55). Por otro lado, empleando la técnica de perfusión de "push-pull" no se observan cambios en la liberación de TRH en ratas lactantes en respuesta al estímulo de la succión (85), y en cambio, la cuantificación de TRH en sangre portal mostró un aumento en la liberación de TRH en respuesta a la succión (59). La técnica de perfusión "push-pull" presenta varias ventajas como son: el medir in vivo la liberación de TRH directamente en el tejido, sin tener que aplicar anestésicos como ocurre en la cuantificación de TRH en sangre portal. Este método tiene la desventaja de que el TRH debe difundir del espacio extracelular hacia la cánula que aspira el fluido, lo que implica que la cánula debe estar muy cerca de la región de liberación. Además, es probable que la PP II pueda interferir en la cuantificación del TRH liberado ya que ésta enzima pudiera degradar al péptido antes de que sea aspirado por la cánula. Recientemente, para el estudio del metabolismo de TRH y de otros neuropéptidos se han combinado estas metodologías con mediciones de la actividad

transcripcional, los niveles de ARNm, de los precursores y de las enzimas procesadoras e inactivadoras para inferir mejor sobre las etapas del metabolismo que se regulan.

Las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular del hipotálamo forman parte del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, regulando la liberación de TSH adenohipofisaria. La TSH regula a su vez los niveles de hormonas tiroideas en el plasma. Es claro que las hormonas tiroideas (HT) ejercen mecanismos de retroalimentación sobre la adenohipófisis y el hipotálamo (Fig 7). En los tirotropos las HT reprimen la transcripción de las subunidades α y β de la TSH (86). En el NPV del hipotálamo la T_3 reduce los niveles del ARNm de TRH (87), hecho que no ocurre en otras regiones del hipotálamo o del cerebro. También se ha propuesto que cambios en el estado tiroideo modifican la liberación de TRH. Esto fué inferido por la disminución observada en el contenido de TRH de la eminencia media (88) en animales hipotiroideos, pero hasta el momento es aún controversial si la liberación de TRH se ve afectada por el estado tiroideo (89).

En cuanto a las enzimas que degradan al TRH, tanto la PP II (solo en la adenohipófisis) como la tiroliberinasa incrementan su actividad en respuesta a una mayor concentración de hormonas tiroideas en plasma; observandose lo contrario cuando las HT disminuyen (90,91). La regulación del metabolismo de TRH y de la TSH por las HT en el eje tiroideo es una respuesta específica de las células que lo integran, que tiene la finalidad de mantener los niveles normales de hormonas tiroideas circulantes (Fig. 7). Es importante notar que en dichas células existe el receptor β para HT, el cual no se encuentra en otras regiones del SNC excepto en hipocampo (92). Esto puede explicar que otras regiones del cerebro que sintetizan TRH no respondan al cambio en los niveles de T_3 .

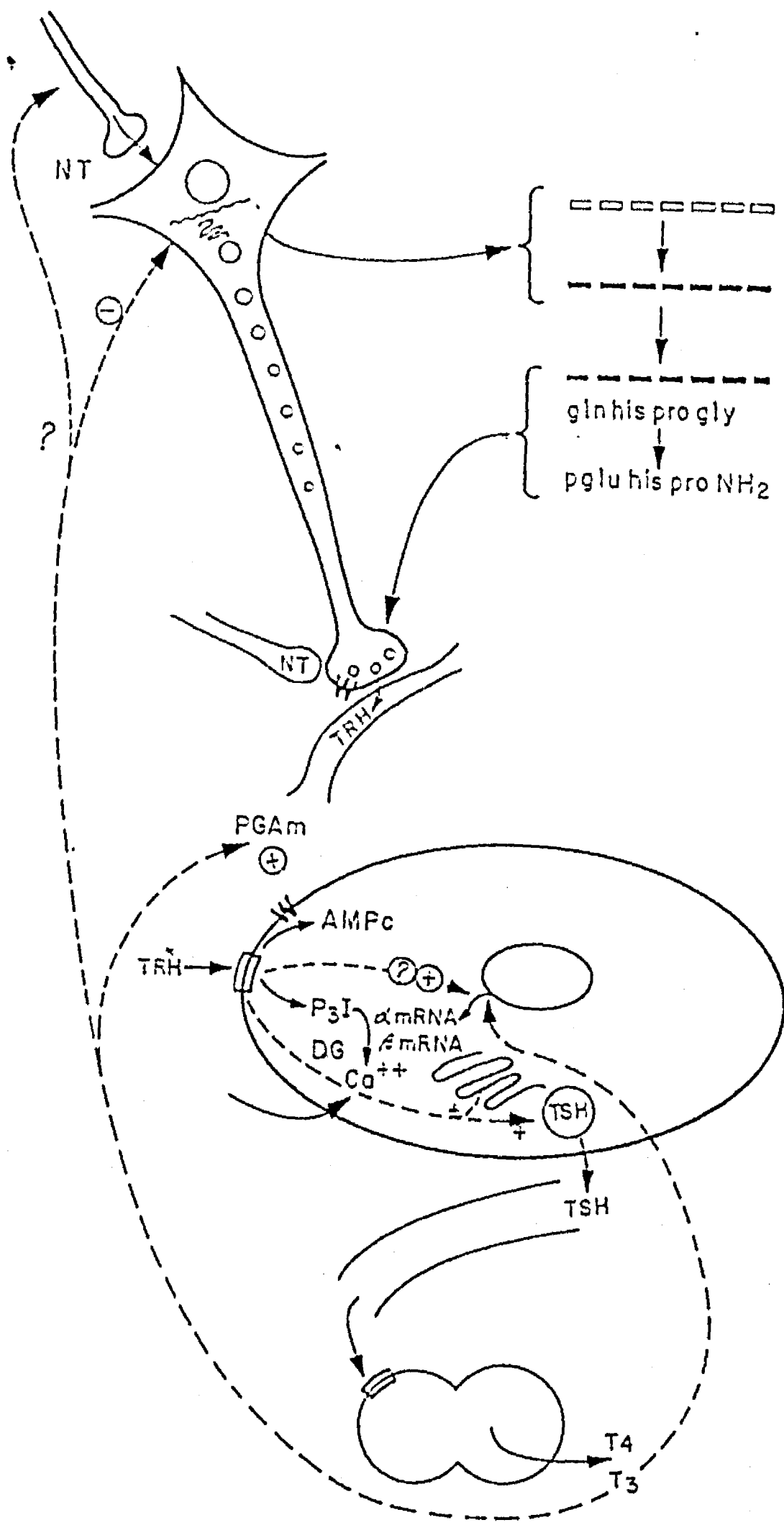


Figura 7

Influencia del estado tiroideo sobre la actividad metabólica de las células del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. Diacil glicerol (DG), inositol trifosfato (P₃I), ARNm de la subunidad α de la TSH (mRNA), ARNm de la subunidad β de la TSH, Neurotransmisor (NT).

Se ha demostrado que las hormonas esteroideas modulan el metabolismo del TRH. Estudios en una línea celular de tiroides (CA77) han demostrado que la dexametasona incrementa los niveles del ARNm de TRH (93). También se encontró que los estrógenos reducen la actividad de la PP II en la adenohipófisis (91).

La biosíntesis de TRH además de responder a los cambios hormonales descritos, también se modula bajo otras condiciones fisiológicas, en las cuales no está claro cuáles son los mensajeros químicos involucrados.

Hemos descrito cambios en los niveles del ARNm de TRH que se correlacionan con los del péptido en el hipotálamo de la rata durante el desarrollo (Fig. 8). Estos datos sugieren que la tasa de biosíntesis limita la concentración de TRH en el hipotálamo durante el desarrollo (ver anexo 2). Los cambios en el ARNm de TRH no deben estar mediados por variación en los niveles de hormonas tiroideas, puesto que no existe correlación entre el patrón ontogénico del ARNm de TRH y el incremento en los niveles de HT observado durante el desarrollo (94). Además, las neuronas del NPV empiezan a responder a cambios en los niveles de T_3 después del séptimo día del nacimiento (95) momento en el cual el ARNm de TRH continúa incrementándose en el hipotálamo (Fig. 8). Otro punto importante es el hecho de que solo el NPV del hipotálamo parece responder a variaciones en los niveles de hormonas tiroideas (87), por lo que el aumento en el ARNm de TRH durante el desarrollo es el promedio de la biosíntesis de TRH en los diferentes núcleos hipotalámicos. Esto sugiere que probablemente varios tipos de efectores controlan el desarrollo de la neurona TRHérgica. Al igual que la biosíntesis de TRH, la ontogenia de la actividad de la PP II en el hipotálamo no parece estar determinada por los niveles de hormonas tiroideas circulantes (94,96) (Fig 8). Por otro lado, en la adenohipófisis (96) el patrón ontogénico de la actividad de la PP II se correlaciona con los cambios de HT observados durante el desarrollo, por lo que las HT pudieran estar definiendo el nivel de PP II en la adenohipófisis. Lo anterior sugiere que el

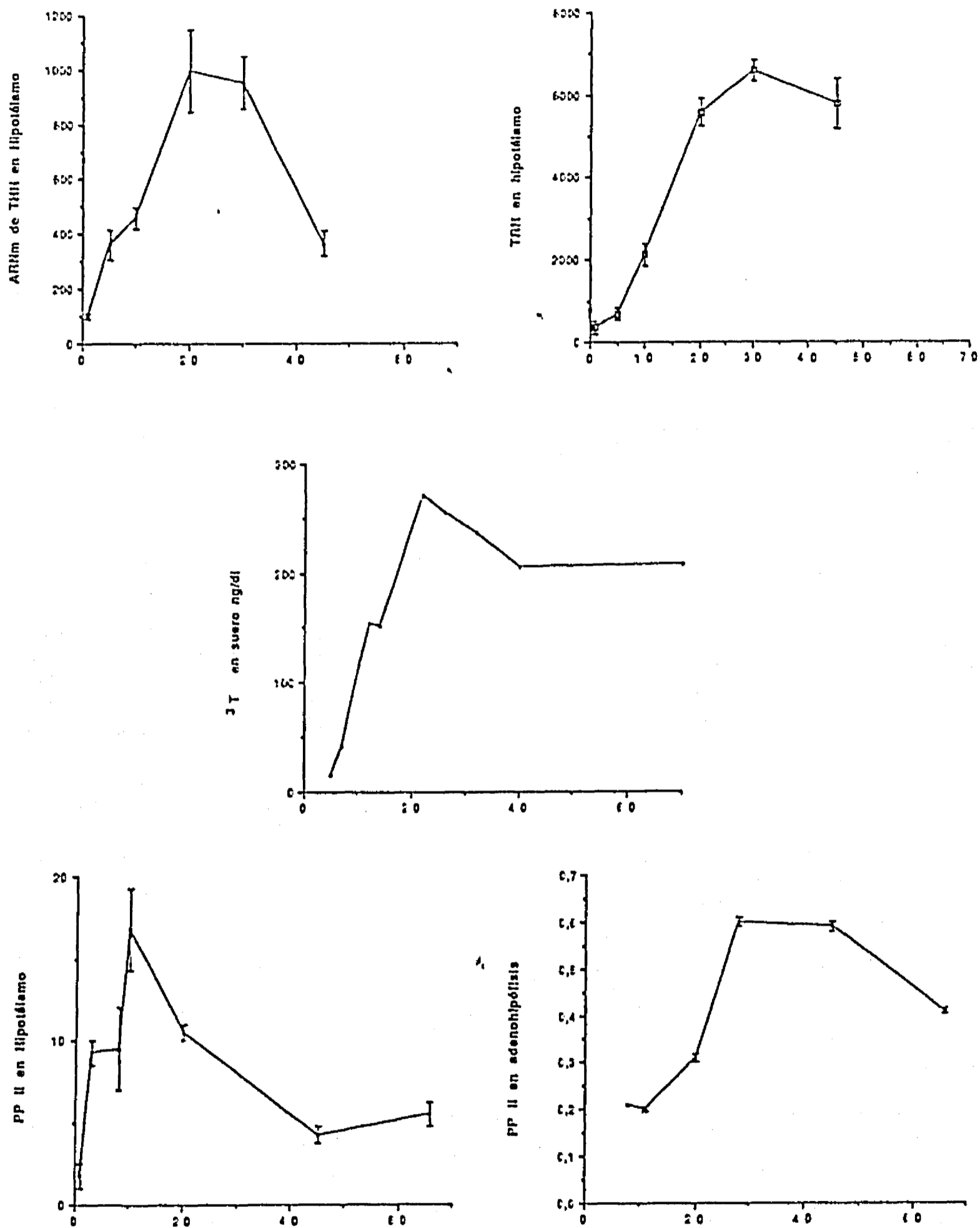


Figura 8

Patrones ontogénicos del TRH (parte superior derecha) y su ARNm (parte superior izquierda), niveles de T₃ (centro) y actividad de PP II en el hipotálamo (parte inferior izquierda); adenohipófisis (parte inferior derecha). La actividad de PP II se expresa en pmoles de hisprNH₂/min/mg de proteína, para el TRH el pg/mg de proteína, T₃ ng/dl, y el ARNm; ARNm/μg ARN ribosomal.

metabolismo de TRH en el hipotálamo durante la ontogenia parece estar modulado por señales no hormonales (factores de crecimiento, neurotransmisores, etc.) que controlan al desarrollo de la neurona TRHérgica.

Varios fenómenos fisiológicos dependen de las fluctuaciones circadianas que presentan los péptidos hipotalámicos, y a su vez estas oscilaciones repercuten directamente en los niveles de varias hormonas circulantes. Específicamente, la TSH oscila en forma circadiana en sangre, y esto pudiera ser una respuesta directa a una secreción circadiana del TRH. De manera indirecta, se ha tratado de determinar si existe liberación circádica de TRH. Varios autores han demostrado que la concentración de TRH en el hipotálamo de la rata presenta un ciclo circadiano. Nosotros determinamos que los niveles de ARNm de TRH presentan un ciclo que se correlaciona con los cambios en el TRH hipotalámico (anexo 2).

Estudios en cultivos de células hipotalámicas sugieren que tratamientos con AMPc por tiempos largos aumentan la concentración del ARNm de TRH y la liberación del péptido, así como una disminución en el contenido intracelular de TRH (97). Tratamientos in vivo con zimelidina (bloqueador de la captura de serotonina) disminuyen los niveles del ARNm de TRH en la bulbo raquídeo (98).

Estos datos sugieren, que otros efectores diferentes a las hormonas tiroideas o glucocorticoides regulan los niveles de ARNm de TRH empleando la ruta de los segundos mensajeros. Es importante notar, que hasta el momento no se ha demostrado claramente que el gene de TRH contenga una secuencia funcional para el reconocimiento de factores transcripcionales que se activan en respuesta a los segundos mensajeros (CREB, AP1), por lo que resultará interesante determinar cual es el mecanismo que opera en el incremento de los niveles de ARNm de TRH en respuesta a efectores que activan receptores membranales.

En resumen, el metabolismo de TRH puede estar regulado por diferentes condiciones

fisiológicas o farmacológicas. Sin embargo, se desconoce la velocidad a la cual puede cambiar y se conoce muy poco sobre los efectores y los mecanismos involucrados en su control metabólico.

OBJETIVOS

La línea de investigación de nuestro grupo de trabajo, consiste en estudiar cuales de las etapas del metabolismo de TRH en las neuronas hipotalámicas están sometidas a regulación (biosíntesis, liberación y/o degradación), cuales son las señales extracelulares involucradas (neurotransmisores, factores locales y/u hormonas) y cuales son los mecanismos intracelulares involucrados en la regulación. También estamos interesados en determinar como se regula el metabolismo del TRH en sus células blanco, los lactótrofos y tirótrofos de la adenohipófisis. Para resolver algunas de estas interrogantes 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 tratamos de determinar si algunos de los eventos del metabolismo del TRH se ven afectados por estímulos neuronales u hormonales que se presenten en las condiciones fisiológicas de interés. Esta estrategia in vivo se complementa con estudios in vitro para determinar los mecanismos involucrados.

El presente trabajo abarca parte de dicho proyecto y el objetivo principal, consistió en determinar si el metabolismo del TRH en el eje hipotálamo-ádenohipófisis está regulado por eventos fisiológicos que involucran cambios, a largo plazo (horas o días) o a corto plazo (min). Este objetivo general se combinó con metas orientadas a discernir si los cambios eran tejido específicos y poder inferir que ocurría con algunas etapas de la biosíntesis del TRH en la neurona TRHérgica in vivo (p. ej. eventos postraduccionales).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en determinar varios parámetros del metabolismo del TRH en animales bajo las siguientes condiciones experimentales: a) durante el ciclo estral, b) a los 18 días de gestación, c) en el periodo de la lactancia, d) al destete. Para probar la respuesta del metabolismo del TRH a estímulos agudos se midieron estos parámetros en respuesta a estrés por frío y a la succión de ratas lactantes. Debido a la existencia de un ciclo circádiano en algunos eventos metabólicos, se hicieron las determinaciones siempre a la misma hora. Los modelos fueron elegidos con la finalidad de poder separar la influencia de estímulos nerviosos y hormonales sobre el metabolismo de TRH para poder sugerir cuales son las posibles señales que modulan la biosíntesis, liberación y/o degradación del TRH en los modelos utilizados. A la par, se midió un parámetro control que nos permitiera monitorear el estado fisiológico del animal.

Los niveles del ARNm de TRH se midieron en el hipotálamo total, el núcleo paraventricular y el area proeóptica/hipotálamo anterior (AP/HA). La cuantificación se realizó empleando técnicas de hibridización tipo Northern, utilizando como sonda el ADNc de TRH de hipotálamo de rata donado por el Dr. H. Goodman, del Departamento de Medicina, Centro Médico Tufts-New England en Boston, Mas, EUA. El TRH fué medido por radioinmunoanálisis en el hipotálamo medio basal (HMB area de proyección de las neuronas TRHérgicas del NPV), area preóptica-hipotálamo anterior y neurohipófisis.

La actividad enzimática de la PP II se midió en la adenohipófisis y la tiroliberinasa en el suero.

Los resultados obtenidos en dos de los modelos experimentales estan en prensa en "Neuroendocrinology"; se incluyen al final de la tesis una copia del manuscrito (anexo1). Los otros resultados (todavía no publicados) se describen de manera mas amplia.

La estrategia escogida permitió en particular comparar a lo largo de varios eventos fisiológicos los niveles de síntesis del TRH en el núcleo paraventricular con su nivel "steady state" en las terminales nerviosas de la eminencia media y su tasa de inactivación en el tejido blanco.

MATERIALES Y METODOS

Animales.

En todos los experimentos se emplearon ratas Wistar que estuvieron con alimento y agua ad libitum, así como con un ciclo de luz-obscuridad de 12 hrs. Se emplearon animales en condiciones fisiológicas diferentes:

I.- a) 18 días de gestación; b) diferentes días del periodo de la lactancia; c) destete: en el día 23 de la lactancia las crías se separaron de sus madres, las cuales se sacrificaron 24 hrs después; d) durante el ciclo estral

II.- En este grupo experimental empleamos ratas (sacrificadas entre las 16-17 hrs) que estaban entre los días 12 y 14 del periodo de la lactancia, y que se mantuvieron bajo diferentes condiciones experimentales:

a) se mantuvieron con crías hasta el momento del sacrificio (C/C);

b) se retiraron las crías por 8 horas antes del sacrificio (S/S);

c) igual que el anterior, solo que antes de sacrificar se regresaron las crías y succionaron 15' (S 15');

d) igual que c) pero con un estímulo de 30'(S 30');

e) igual que c) pero el estímulo fué de 45'-60' (S 45'-60);

f) igual que e) con la diferencia de que una vez que finalizó el estímulo, se retiraron las crías y los animales fueron sacrificados 48 hrs después (S 45'-60'/48hr);

g) igual que b) pero los animales fueron sacrificados 48hrs después (S/ S/ 48);

III.- En este grupo los animales se colocaron justo antes de iniciar el experimento en cajas individuales. Los grupos controles se colocaron en un cuarto a temperatura ambiente al mismo tiempo que los tratados se introdujeron a un cuarto entre 4-5 °C. El sacrificio se realizó entre 8-11 A.M., a diferentes momentos 2.5', 5', 10', y 0.5, 1, 2, 6, 12 horas después de haberlos puesto en los dos cuartos.

Cuantificación por radioinmunoensayo de TRH, PRL, corticosterona, y T₃.

El TRH fué cuantificado como se reportó por Joseph et al.,1979 (78) y la PRL en base a Enjalbert et al., 1980 (99), la corticosterona se midió empleando un kit de diagnóstico de ICN, y la T₃ se cuantifico según el método descrito por Valverde et al., 1982 (100).

Purificación de ARN.

El aislamiento se efectuó siguiendo el método descrito por Covarrubias et al., 1989 (anexo 2).

Cuantificación del ARNm específico de TRH.

Ver materiales y métodos del anexo 1.

Determinación de la PP II en adenohipófisis y tiroliberinasa en suero.

La medición se realizó empleando la técnica descrita por Vargas et al, 1987 (Ver anexo 1).

Determinación de Proteínas.

La cuantificación se realizó por el método de Lowry et al.,1951 (101).

Análisis estadístico.

El análisis estadístico fué realizado empleando análisis de varianza de Fisher. Los resultados se consideraron significativos con una $p < 0.05$ o menor. Siempre que el análisis de varianza resultó significativo los diferentes grupos se analizaron en forma individual empleando el método de Duncan.

RESULTADOS

I. Niveles hipotalámicos del ARNm de TRH y actividad de PP II adenohipofisaria durante el ciclo estral de la rata.

Estos resultados y los del capítulo II están incluidos en el anexo 1 por lo que solo se describirán de manera breve en esta parte de la tesis.

Los niveles hipotalámicos del ARNm de TRH y de la actividad de PP II en adenohipófisis variaron significativamente y en forma opuesta en los diferentes días del ciclo (diestro 1 = D₁, diestro 2 = D₂, proestro = P, estro = E). (Tabla 1; Figs. 3 y 4 del anexo 1). Los niveles más altos de ARNm ocurrieron en el D2 y simultáneamente se observó la actividad más baja de la PP II. En contraste, durante el E el ARNm disminuyó, mientras que para la PP II se detectó la actividad máxima.

II. Cambios en el metabolismo de TRH en el día 18 de la gestación, durante la lactancia y en el destete.

a) Niveles circulantes de PRL.

Los niveles más bajos se detectaron en el día 18 de la gestación y al destete. Mientras que en el periodo de la lactancia la concentración de PRL se incrementó desde el primer día hasta el día 15 (Tabla 2; Fig. 1 del anexo 1). Los cambios observados en la PRL circulante en este modelo fueron similares a los previamente reportados por Simpson et. al. 1973 (102). Además, como se puede apreciar en la Fig. 1 del anexo 1 las fluctuaciones de PRL en sangre correlacionaron con los cambios observados en el contenido de TRH en el HMB.

b) TRH en hipotálamo medio basal y neurohipófisis..

Las concentraciones más elevadas de TRH en el HMB se observaron en el día 18 de la gestación y al final de la lactancia. Al inicio de la lactancia (3-12 hrs después del parto), el nivel del péptido disminuyó significativamente con respecto al día 18 de la gestación. Posteriormente, a partir del día 5 de la lactancia el nivel de TRH aumentó hasta alcanzar (día 10) niveles similares a los observados al final de la gestación. Al destete la concentración del péptido nuevamente disminuyó con respecto a el día 15 de la lactancia (Tabla 2; Fig. 1 del anexo 1). En la NH el TRH también varió, pero a diferencia de lo que ocurrió en el HMB (Tabla 2; Tabla 1 del anexo 1), en el día 18 de la gestación el nivel de TRH fue menor al determinado en el día 10 de la lactancia. De manera similar al HMB, durante la lactancia los niveles de TRH se incrementaron hasta llegar a un máximo al día 15 de la lactancia. Al destete el TRH disminuyó en la NH al nivel del día 18 de la gestación con respecto al día 10 de la lactancia.

c) ARNm de TRH en el NPV del hipotálamo.

Durante el día 18 de la gestación y el primero de la lactancia detectamos la mayor cantidad de ARNm de TRH en el NPV hipotalámico y posteriormente se observó una disminución significativa que se mantuvo constante hasta el destete (Tabla 2; Fig. 2 del anexo 1).

d) Actividad adenohipofisaria de PP II y actividad de la tiroliberinasa en el suero.

Como se resume en la Tabla 2 la actividad de ambas enzimas no mostraron cambios significativos durante el periodo de la lactancia comprendido entre los días 1 y 29 (Tabla 2 del anexo 1).

Tabla 2

	día 18 de la gestación ^a	Periodo de Lactancia (días)				
		1 ^b	5 ^c	10 ^d	15 ^e	Destete ^f
TRH en HMB pg/órgano	3095 ± 294 ^{b***} (7)	1754 ± 272 ^e (5)	2162 ± 272 (7)	2570 ± 290 (7)	3018 ± 273 ^b (7)	1929 ± 625 ^{***} (7)
ARNm de TRH en NPV unidades corregidas por la con. de ARN ribosomal	0.74 ± 0.06 ^{c***} (7)	0.69 ± 0.06 ^e (7)	0.47 ± 0.08 ^b (7)	0.39 ± 0.06(7)	0.51 ± 0.06 (7)	0.46 ± 0.04 ^{b*} (7)
PP II adenohipofisaria pmoles/min/mg	ND	0.053 ± 0.007 (4)	0.049±0.007 (4)	0.050 ± 0.01(4)	0.050±0.015 (4)	ND
Tiroliberinasa en suero pmoles/min/mg	ND	0.248 ± 0.022 (3)	0.200±0.010 (3)	0.281±0.026(3)	0.189±0.042 (3)	ND
TRH en NH pg/órgano	5 ± 9 (3)	ND	90 ± 32 (3)	137 ± 36 (3)	115 ± 37 (3)	71 ± 38 (3)
PRL en sangre ng/ml	2.64 ± 0.19 ^e (7)	11.7 ± 5.96 (7)	25.7 ± 5.5 ^{a*} (7)	37.7 ± 13 ^b (7)	38.6 ± 11.8 ^b (7)	3.48 ± 0.56 ^{a*} (7)

Los valores son el promedio ± EEM, los números entre paréntesis corresponden a la cantidad de muestras procesadas. Significancia *: p< 0.05; **: p< 0.025; ***: p< 0.01.

III. Influencia del estímulo de la succión sobre el metabolismo del TRH.

Con la finalidad de estudiar como se afecta por la succión el metabolismo del TRH en el eje tiroideo, empleamos hembras en periodo de lactancia (con una camada fija) que fueron separadas de sus crías por 8hr. Una vez transcurrido el lapso de 8 hr reunimos nuevamente a las madres con sus crías para que éstas succionaran a la madre. Este modelo experimental es difícil de controlar, debido a que no todos los animales responden de igual manera cuando son puestos en contacto con sus crías. Por ejemplo, algunas hembras empiezan a amamantar rápidamente a sus crías una vez que se les regresan a su caja, sin embargo otras requieren de cierto tiempo (10-20 min) antes de empezar a alimentar a sus crías. En algunos casos, las hembras alimentan a sus crías por 10', dejan de alimentar aproximadamente 5' y continúan posteriormente. Debido a lo anterior, cuantificamos los niveles de corticosterona y/o PRL en suero como un control de que los animales respondieron al estímulo de la succión.

a) Niveles de corticosterona en suero.

Como ya se había reportado previamente (103), observamos que la corticosterona en suero se eleva en las hembras lactantes que fueron succionadas por sus crías (Fig.9). Los incrementos medidos en los grupos succionados por 15', 30', y entre 45 a 60' alcanzaron 24, 23 y 13 veces respectivamente con respecto al grupo que no fué succionado. Además, como también se muestra en la Fig. 9, los niveles de corticosterona fueron bajos en los grupos que se succionaron 45'-60' y después estuvieron durante 48 hr sin succión, y en el grupo que se mantuvo 48 hrs sin haberle presentado nuevamente el estímulo.

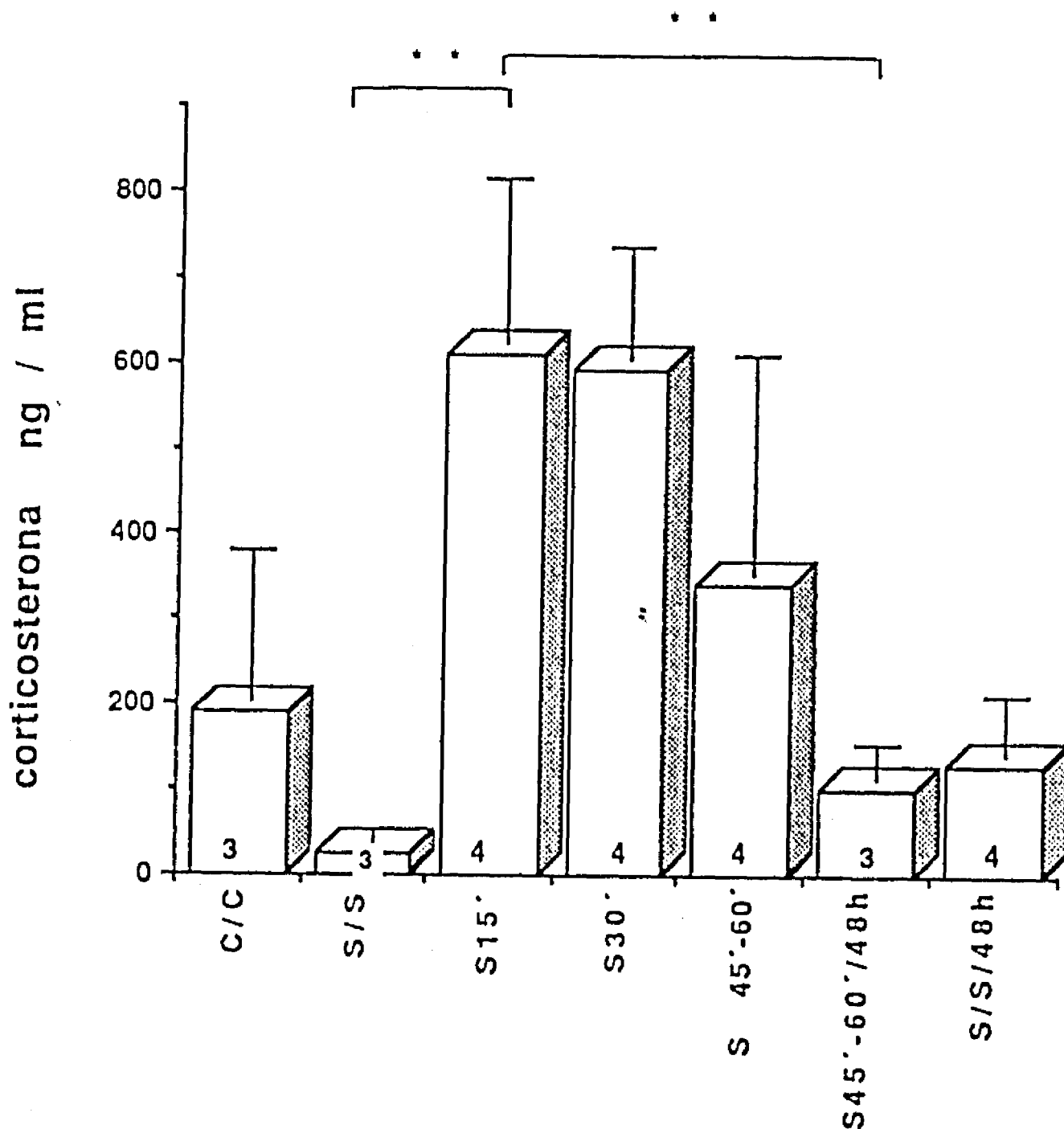


Figura 9

Efecto de la succión en la concentración de corticosterona en suero.

En todos los grupos experimentales se emplearon ratas entre los días 12-14 de la lactancia, a las hembras se les ajustó la camada a 8 crías entre el primer y segundo día después del parto. Los animales fueron sacrificados entre 16-17 hrs. Se emplearon los siguientes grupos experimentales:

- C/C Las hembras se mantuvieron con sus crías hasta el momento del sacrificio.
- S/S Las hembras fueron separadas de sus crías por 8 hrs antes de sacrificarlas.
- S15' Las crías fueron retiradas de sus madres por 8 hrs, transcurrido el periodo regresamos nuevamente a las crías para que éstas succionaran durante 15', e inmediatamente después la madre fué sacrificada.
- S30' Igual que el grupo anterior solo que el periodo de succión fué de 30'.
- S45'-60' Igual que S 15', excepto que el periodo de succión fué de 45'-60'.
- S45'-60'/48h Igual que el anterior solo que el sacrificio se realizó 48 hrs después de la succión.
- S/S/48h Este grupo es igual al grupo S/S solo que se sacrificó 48hr después.

El análisis estadístico se realizó empleando el análisis de varianza descrito por Fisher; se consideró significativo con una $p < 0.05$ o menor y la diferencia entre dos grupos se comprobó por el método de comparaciones múltiples de Duncan. Los histogramas representan el promedio \pm EES. Los números dentro de las columnas corresponden al número de muestras procesadas. Significancia: **: $p < 0.01$.

b) Niveles de PRL en suero.

Otros autores han reportado (103) que se libera una gran cantidad de PRL de la adenohipófisis en respuesta al estímulo de la succión. De acuerdo con estos resultados observamos un aumento de 7 y 5 ($p < 0.01$) veces en los animales que fueron succionados 15' y 30' respectivamente contra los que no se succionaron (Fig. 10). Por otro lado, en la Fig. 10 se observa que al separar a las hembras de sus crías, los niveles de PRL disminuyen importantemente.

c) TRH en el HMB y la NH.

El contenido de TRH en el HMB disminuyó significativamente 22% ($p < 0.05$) y 33% ($p < 0.01$) después de un periodo de succión de 30' y de 45-60' respectivamente (Fig. 11). Como se observa en la Fig. 11, no hubo variación en el nivel de TRH en el HMB de los animales que se mantuvieron con o sin crías durante el periodo de 8hrs. También se observó que en los grupos de animales que fueron sacrificados 48 hr después de haber o no recibido un estímulo de 45'-60' de succión los niveles de TRH fueron los más bajos de todos los grupos experimentales.

Resultados preliminares muestran que en la neurohipófisis, a diferencia del HMB, el estímulo de la succión aumentó los niveles de TRH. En el grupo que fué succionado por 30' detectamos incrementos del 59% y 82% con respecto al grupo que no fué succionado y al que se mantuvo con crías todo el tiempo, respectivamente. (Tabla 3).

d) ARNm de TRH en el NPV hipotalámico.

En el NPV hipotalámico de ratas lactantes, el ARNm de TRH también cambió en respuesta al estímulo de la succión. No observamos diferencias en los niveles de ARNm de TRH entre el grupo que se mantuvo constantemente con las crías y el que no fue succionado por 8 hrs y contra el que fué succionado solo por 15' después de 8 hrs sin

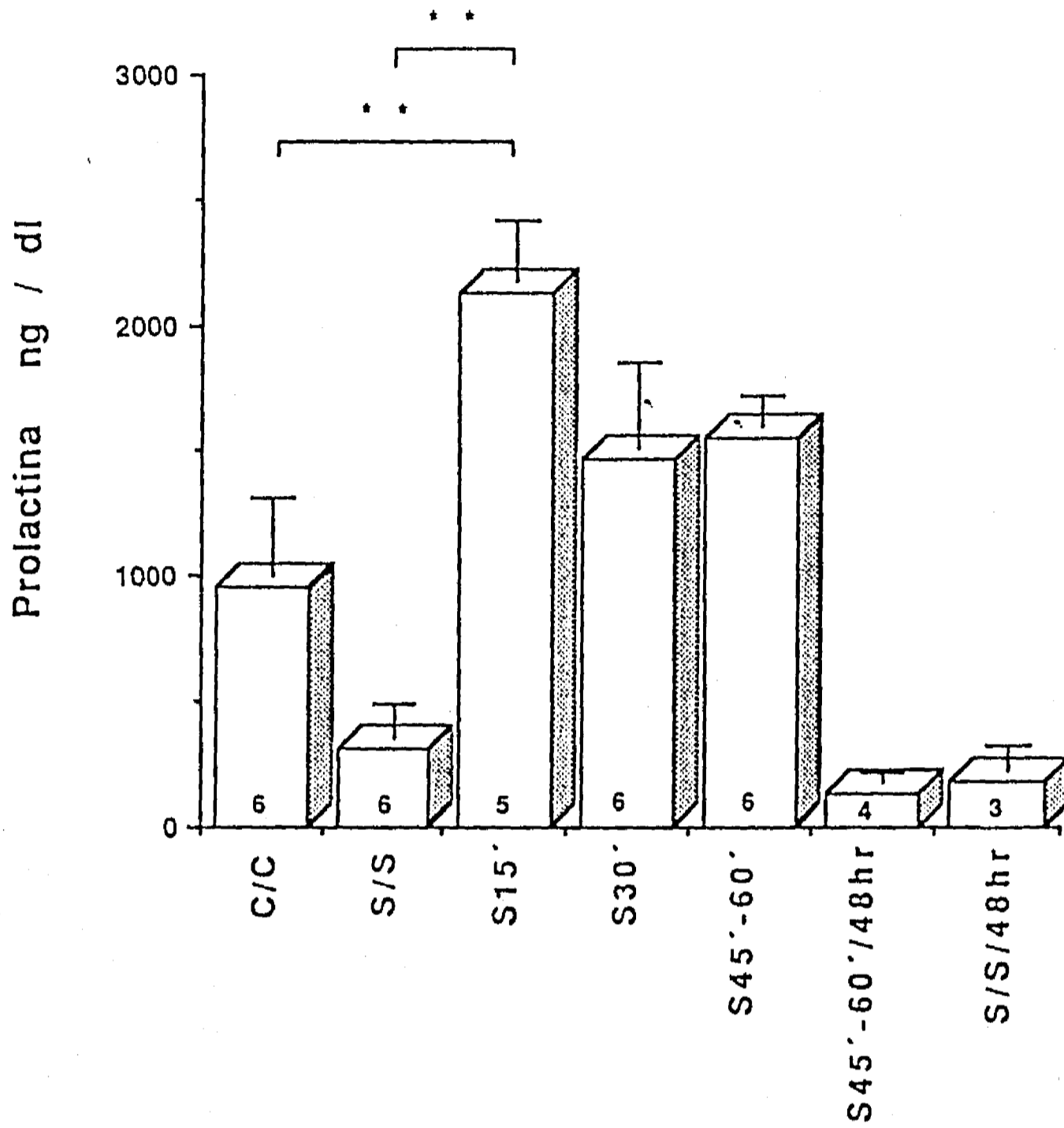


Figura 10.

Niveles de PRL en suero en respuesta a la succión.

Las abreviaturas se explican en la leyenda de la Fig. 9. Significancia: **: $p < 0.01$.

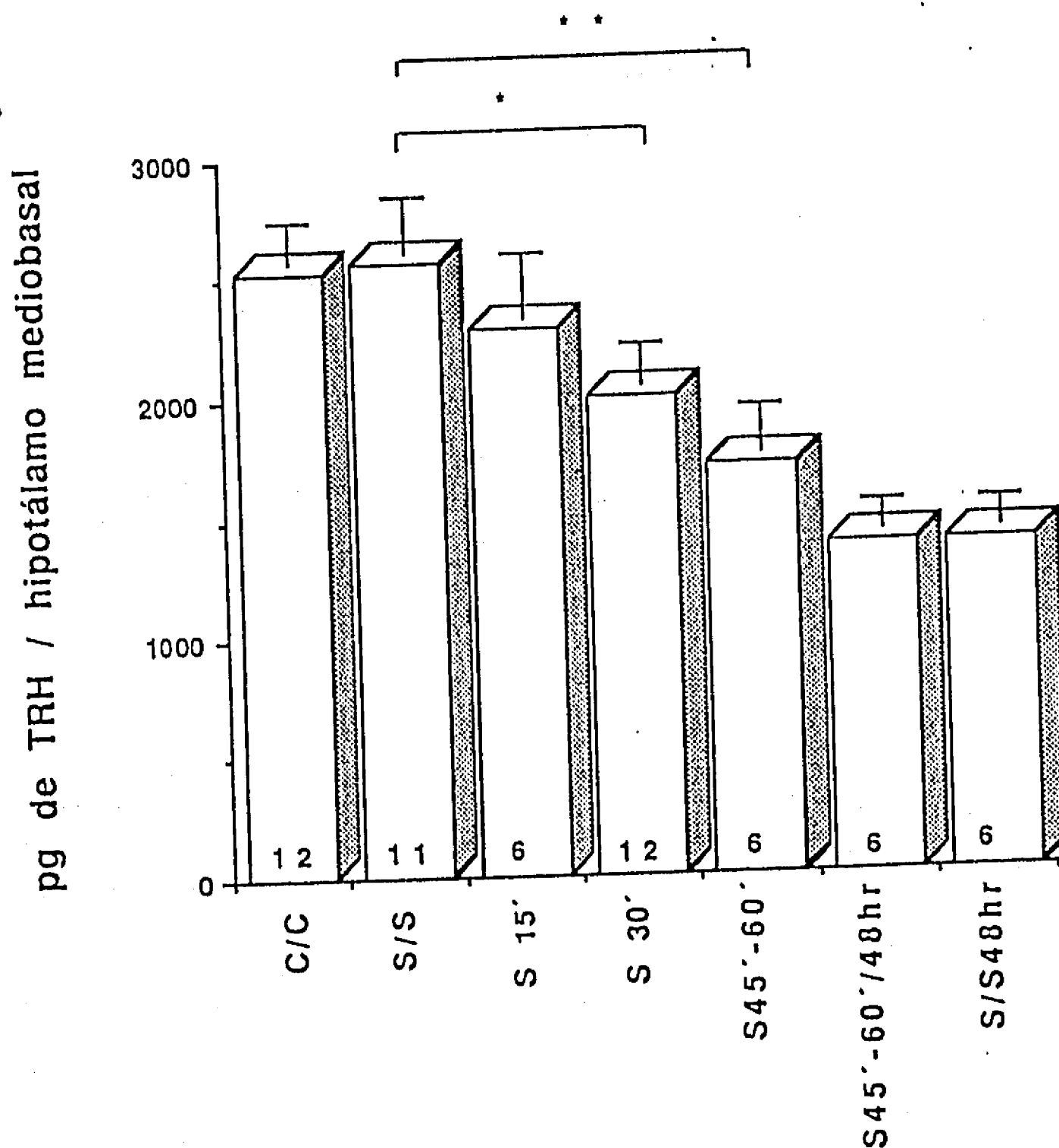


Figura 11

Efecto de la succión sobre los niveles de TRH en el HMB de ratas lactantes.

Ver abreviaturas en la Fig. 9, los números de la parte inferior de las barras corresponden al número de muestras analizadas. Significancia: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Tabla 3

Niveles de TRH en neurohipófisis en respuesta a la succión.

	TRH
	pg / órgano
Con Crias	66 ± 9 (3)
Sin succión	81 ± 22 (3)
Succión 30'	121 ± 45 (3)

Los valores son el promedio ± EEM; el número entre paréntesis corresponde al número de muestras medidas (cada muestra corresponde a los pg medidos dos neurohipófisis).

crias. Cuando comparamos el grupo que no fué succionado contra el que se succionó por 30' observamos que el nivel de ARNm de TRH incrementó 54% ($p < 0.01$) (Fig. 12). Como se puede apreciar en la Fig. 12, si se continúa por tiempos mas largos de estímulo (45'-60') el nivel de ARNm de TRH baja rapidamente (48%, $p < 0.01$ comparado con el nivel a los 30'). Animales que se mantuvieron por 48 hr sin crias, con o sin un estímulo de 45'-60', tuvieron un nivel de ARNm similar al de animales que se mantuvieron o fueron separados por 8hrs de sus crias (Fig. 12).

Resultados preliminares muestran una clara variación en la actividad de la PP II adenohipofisaria. Observamos una actividad menor en las adenohipófisis de animales que se mantuvieron con crias hasta el momento del sacrificio con respecto a lo determinado en aquellos animales a los que se les retiraron las crias por un periodo de 8 hr antes del sacrificio (0.12-0.13 vs 0.19-0.21 pmoles de his-proNH₂/min/mg de proteína). Además, no observamos variación en la actividad de la PP II entre los animales que fueron succionados por 30' con respecto a los que no se succionaron (0.18-0.26 vs 0.19-0.21 pmoles His-ProNH₂/min/mg de proteína). Por otro lado, la tiroliberinasa (Fig.13) disminuyó 41% ($p < 0.01$) en respuesta a un estímulo de succión de 15'. Posteriormente la actividad de la tiroliberinasa se recuperó gradualmente aún cuando se continuó por mas tiempo el estímulo (30' o 45'-60'). Se detectó una actividad similar entre el grupo que fué sacrificado después de permanecer 48 hr sin crias y el grupo sin haberle presentado estímulo. Por otro lado, en el grupo al que presentamos el estímulo de succión 45'-60', y que sacrificamos 48 hrs después, se observó una actividad mas baja (32%, $p < 0.01$) que el grupo que se mantuvo por 48 hrs sin crias.

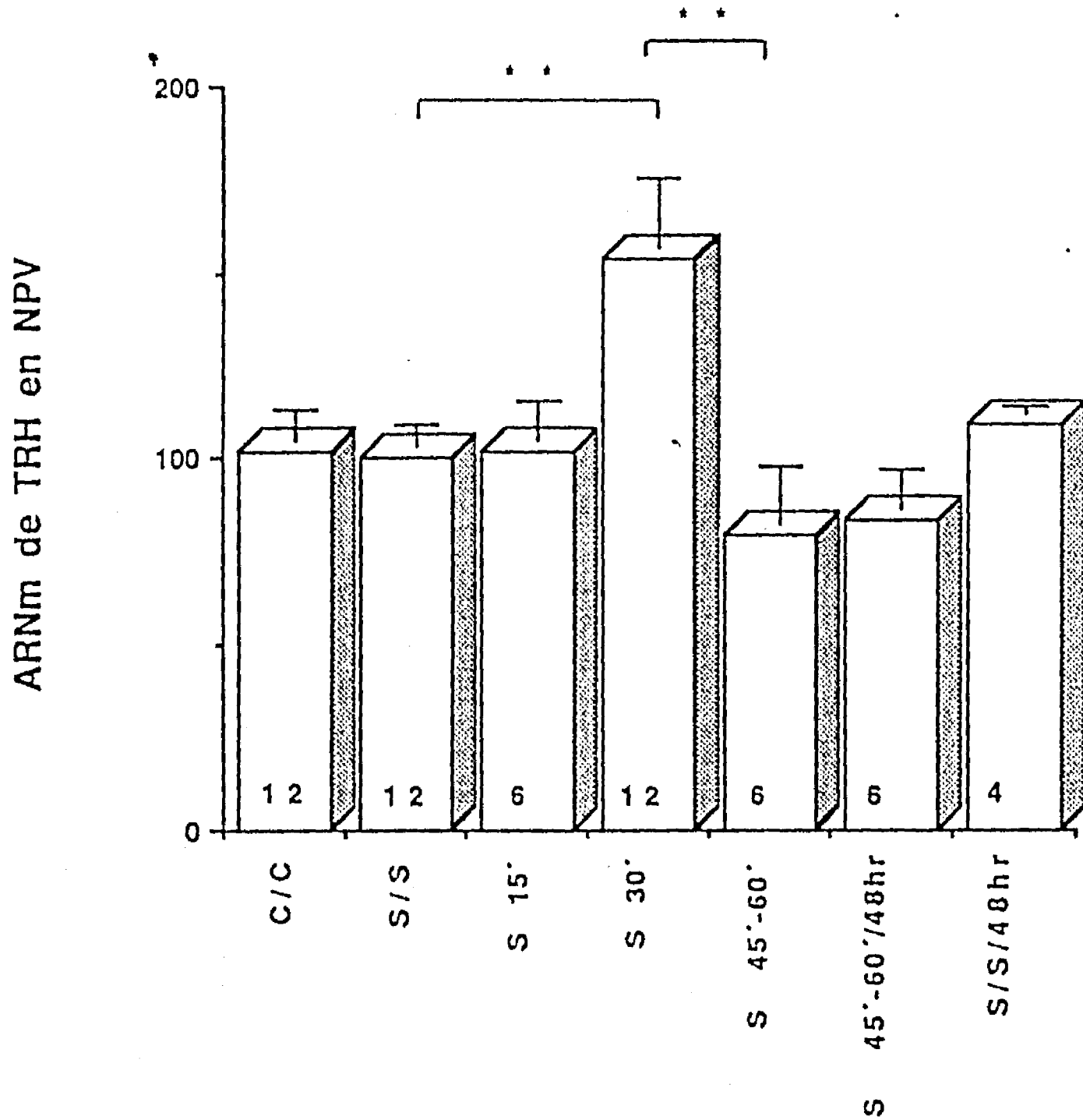


Figura 12

Niveles de ARNm de TRH en el NPV del hipotálamo de ratas lactantes estimuladas por succión.

Las columnas representan al promedio \pm EEM del análisis densitométrico de la señal autoradiográfica obtenida en hibridaciones tipo Northern entre el RNA total del NPV y el ADNc de hipotálamo de rata marcado por "nick translation". La señal fué corregida por la cantidad de rRNA que había en el gel antes de transferirlo a la membrana de nitrocelulosa. Las abreviaturas de la Fig. se especifican en la Fig. 9.

Nivel de significancia: **: $p < 0.01$.

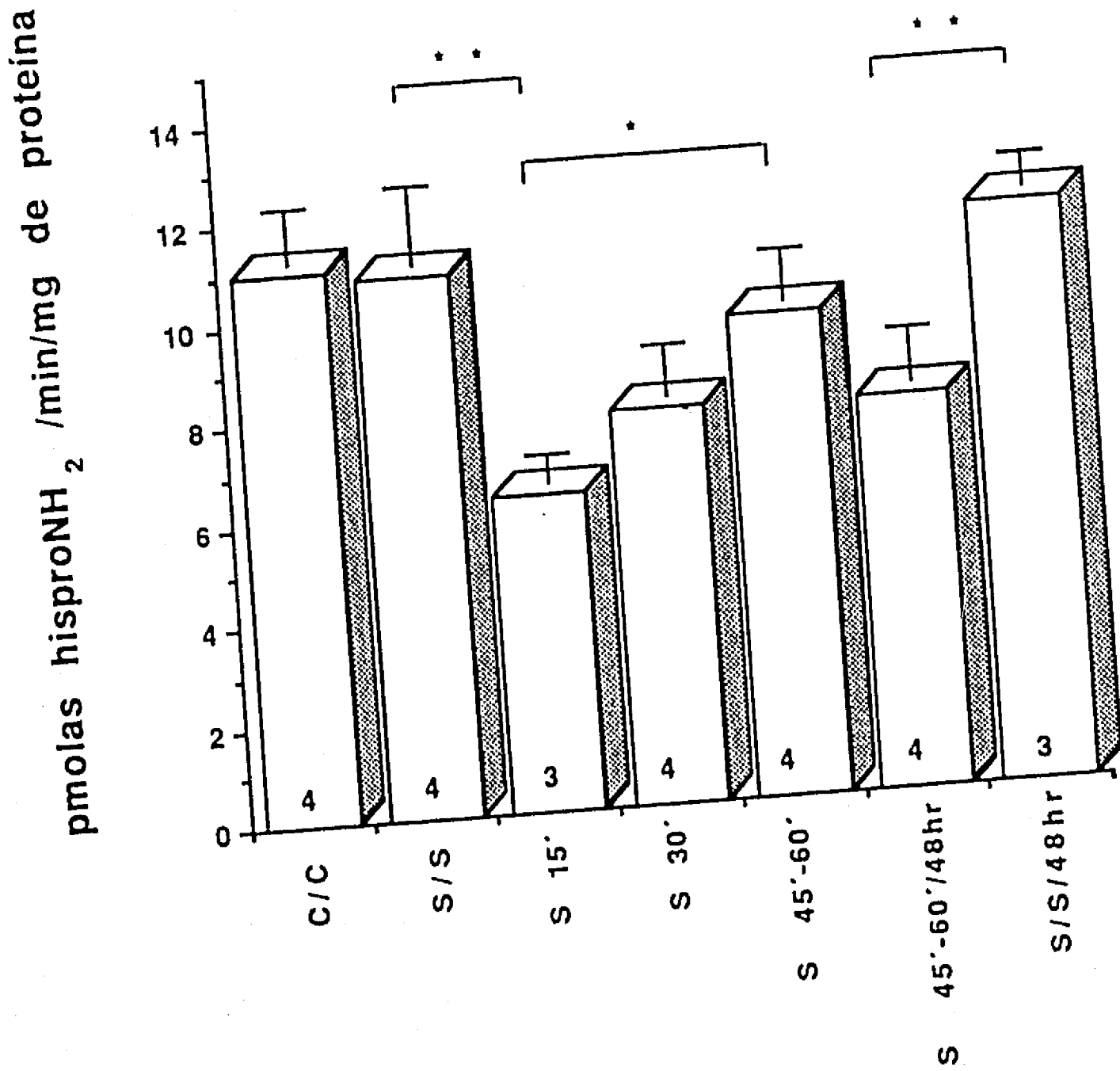


Figura 13

Influencia de la succión sobre la actividad de la Tiroliberinasa en el suero de ratas lactantes.

Ver las abreviaturas en la Fig. 9, los números de la parte inferior de la gráfica corresponden al número de muestras analizadas. Significancia: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

IV. Regulación del metabolismo de TRH en ratas machos expuestas al frío.

a) Hormonas tiroideas en suero.

Como un control experimental medimos los niveles de T_3 en suero. Esta hormona aumentó 2.4 veces ($p < 0.01$) en los animales que se expusieron al frío por 0.5-2 hrs contra los que solo estuvieron 2.5' entre 4-5 °C (Fig. 14a).

b) Niveles de TRH en HMB.

En las Figs. 14b y 15 se observa la cinética de respuesta que observamos en el contenido de TRH del HMB en ratas que se colocaron en un cuarto a temperatura de 4 a 5°C por 2.5' a 12 hr. Como se puede apreciar, determinamos una disminución significativa en el contenido del TRH en el HMB a los 5' y una recuperación rápida a los 10' de exposición al frío (Fig. 14b). A tiempos mas largos de tratamiento el nivel de TRH se mantuvo constante (Fig.15).

c) Niveles de ARNm de TRH en el NPV y el AP/HA

Determinamos el nivel de ARNm de TRH tanto en el NPV como en el AP/HA en animales expuestos al frío durante 0.5, 1, 2, 6 y 12 horas. En el NPV observamos que el ARNm se incrementó y disminuyó rápidamente en las ratas que se expusieron al frío con respecto a los animales que se mantuvieron a temperatura ambiente (Fig. 16). 30' ó 1 hr de exposición al frío incrementó 28% y 42% ($p < 0.05$) respectivamente, los niveles del ARNm comparandolos con los controles, mientras que si comparamos los dos grupos tratados, el aumento entre 30' y 60' fué de 38% ($p < 0.05$). Tratamientos por 2 hrs provocaron una caída del ARNm de TRH de 36% por abajo del grupo control y 100% ($p < 0.01$) con respecto a 1hr de tratamiento. Con exposiciones a tiempos largos (6 hrs), el ARNm específico se recuperó al nivel del grupo control.

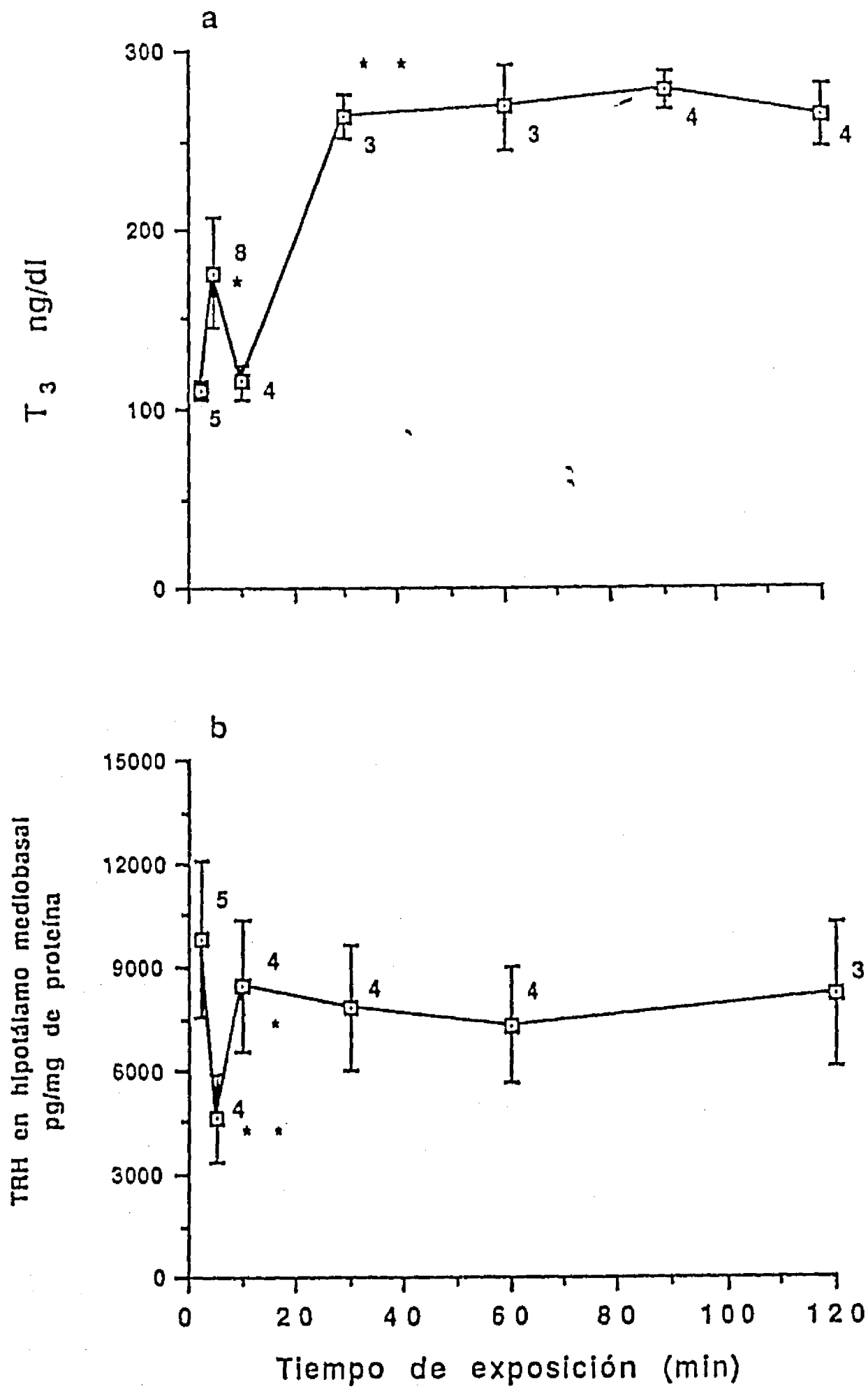


Figura 14

Efecto del estrés por frío sobre: (a) los niveles de T₃ en el y (b) el contenido de TRH en HMB. Los números corresponden al número de muestras experimentales.

Nivel de significancia: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

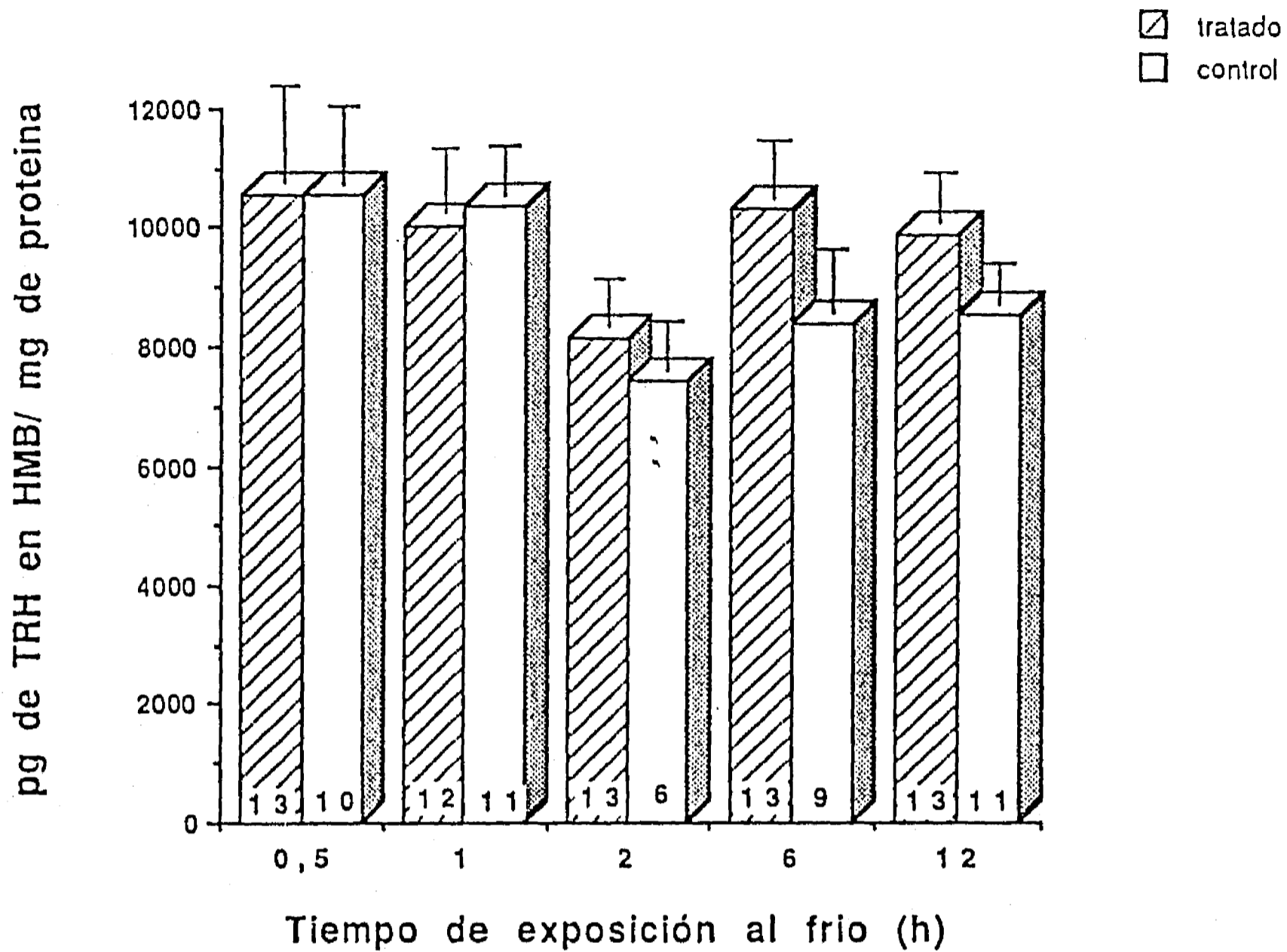


Figura 15

Influencia de tiempos largos de exposición al frío sobre el contenido de TRH en el HMB en ratas machos. Los números que están dentro de las columnas representan el número de animales empleados por grupo experimental.

En el AP/HA observamos también que el ARNm de TRH fluctuó rápidamente. 30' de exposición al frío indujeron un aumento en el ARNm de 144% ($p < 0.01$) contra el control (Fig. 17). Como se puede apreciar en la cinética de exposición al frío, el ARNm de TRH regresó al nivel del grupo control a las 2 hrs de tratamiento. Posteriormente, a las 6 hrs de exposición al frío el ARNm incrementó su nivel 136% ($p < 0.01$) con respecto a las 2 hrs de tratamiento y 200% ($p < 0.01$) contra el grupo control. A las 12 hrs de tratamiento, el ARNm nuevamente disminuyó al nivel del control.

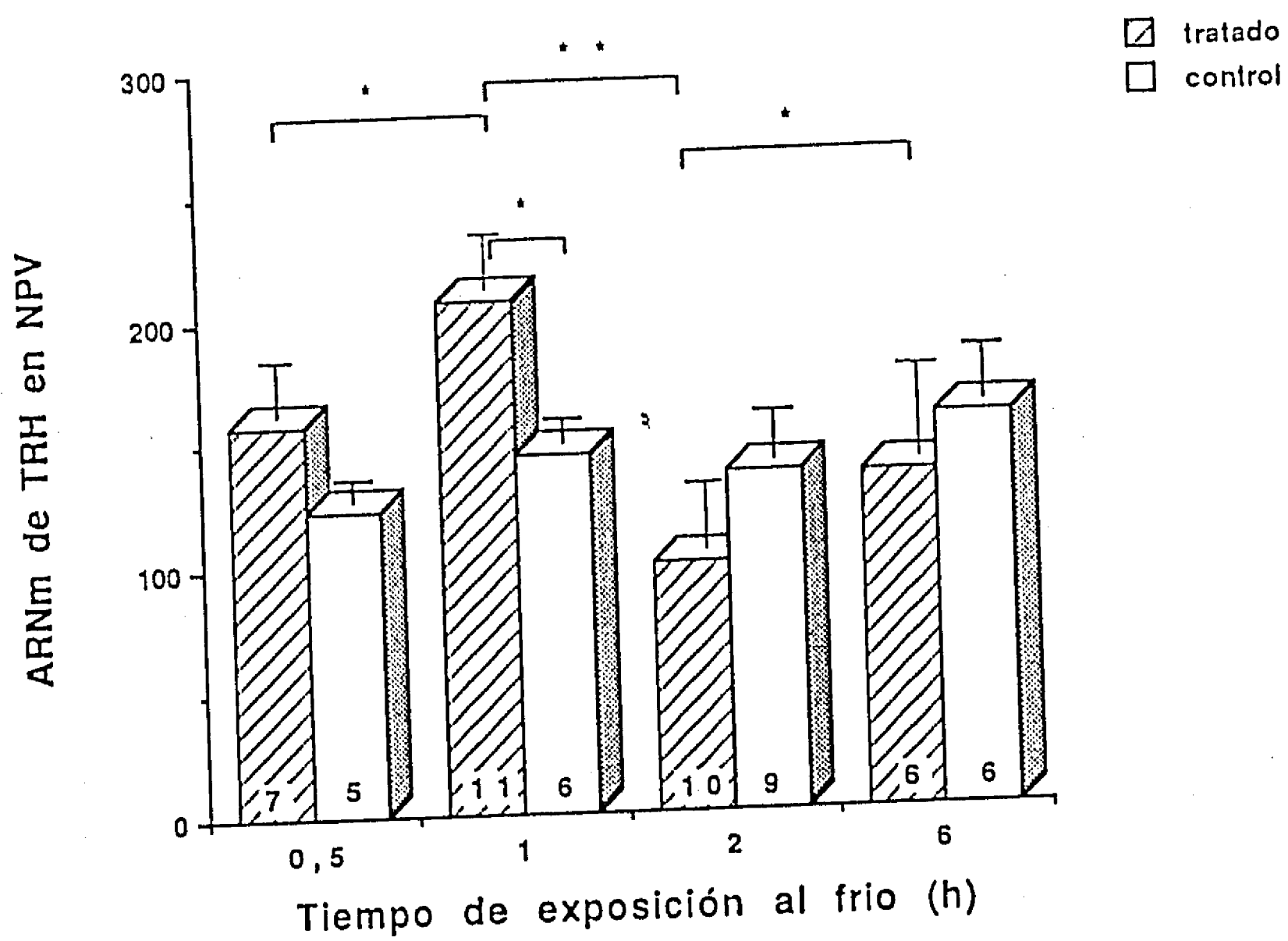


Figura 16

Influencia de la exposición al frío por tiempos largos en ratas machos, sobre el nivel de ARNm de TRH en el NPV hipotalámico. Grado de significancia *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

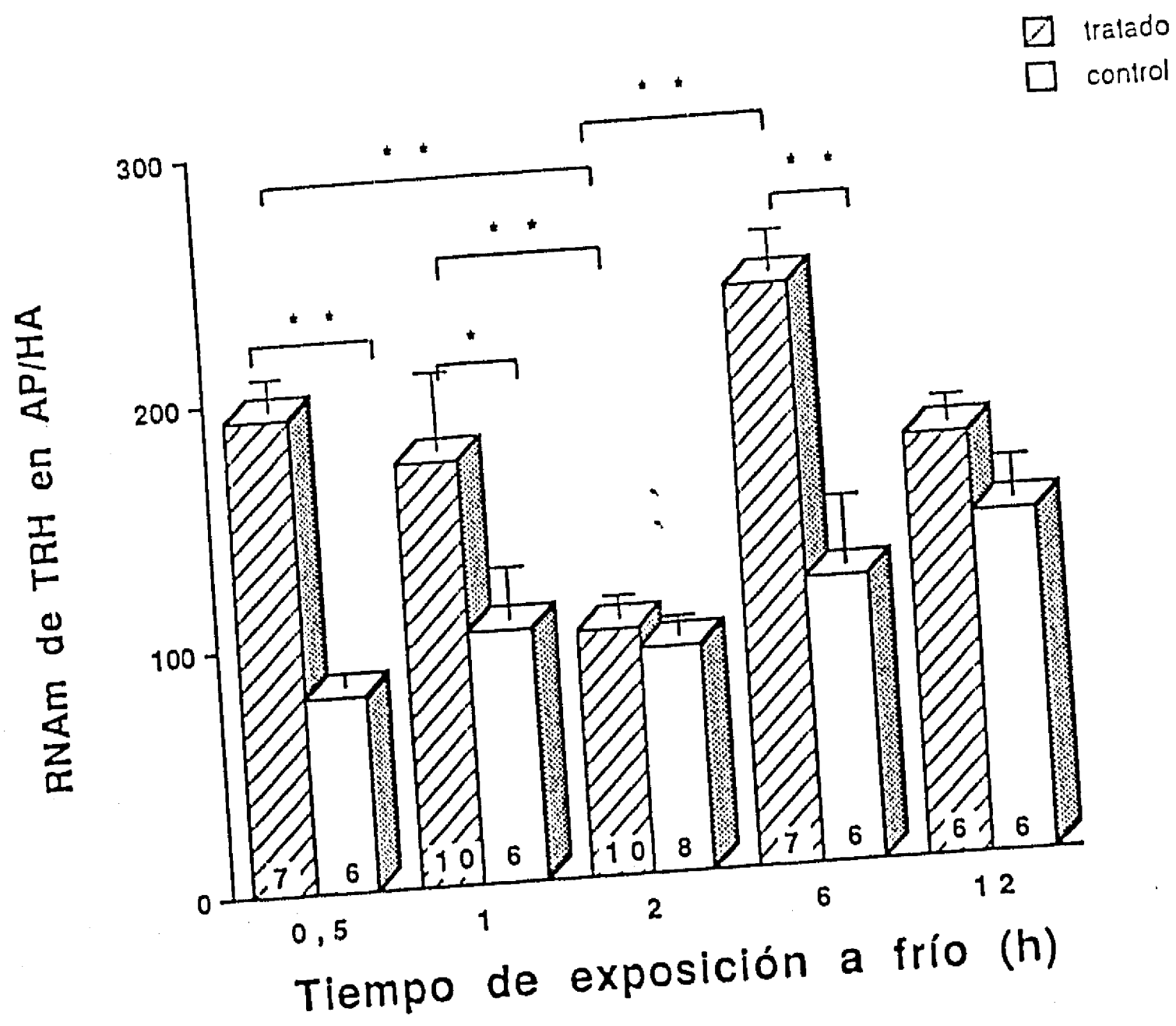


Figura 17

Niveles de ARNm de TRH en el AP/HA de ratas sometidas a estres por frío. Grado de significancia: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

DISCUSION

El metabolismo del TRH en las neuronas TRHérgicas implica varios eventos: biosíntesis, compartamentalización, procesamiento, liberación y degradación. Es la resultante de éstos lo que determinará las concentraciones fisiológicamente activas en una condición determinada. El TRH sintetizado por las neuronas del NPV esta involucrado en la liberación de TSH y PRL en diferentes estados fisiológicos como son el ciclo estral, la respuesta al frío y a la succión. Con el objeto de estudiar el metabolismo del TRH en estas neuronas, determinamos varios parámetros que lo reflejan.

Analizaremos inicialmente los datos obtenidos en los modelos fisiológicos no controlados experimentalmente (ciclo estral y de la lactancia). Posteriormente, aquellos en los se controló experimentalmente la exposición a un estímulo exógeno como es la succión y la exposición al frío.

Ciclo Estral

Previamente habíamos observado que tanto el ARNm de TRH como el péptido medido por RIA en el hipotálamo fluctuan en forma circádica coincidiendo los niveles del ARNm de TRH con los del péptido, así como con la liberación de TSH en la sangre (anexo 2). A diferencia de lo observado en las oscilaciones circádicas, durante el ciclo estral existe un desfase de 24 hr entre el pico del ARNm de TRH y el de la liberación de TRH a la sangre portal o de PRL a la sangre periférica (58). Este desfase ocurre también cuando se compara el ARNm de LHRH en el área preóptica y la liberación de LH en el proestro (104); y en este caso sabemos que la actividad metabólica de las neuronas LHRHérgicas se modifica al momento que ocurre la liberación de LH (105). Los

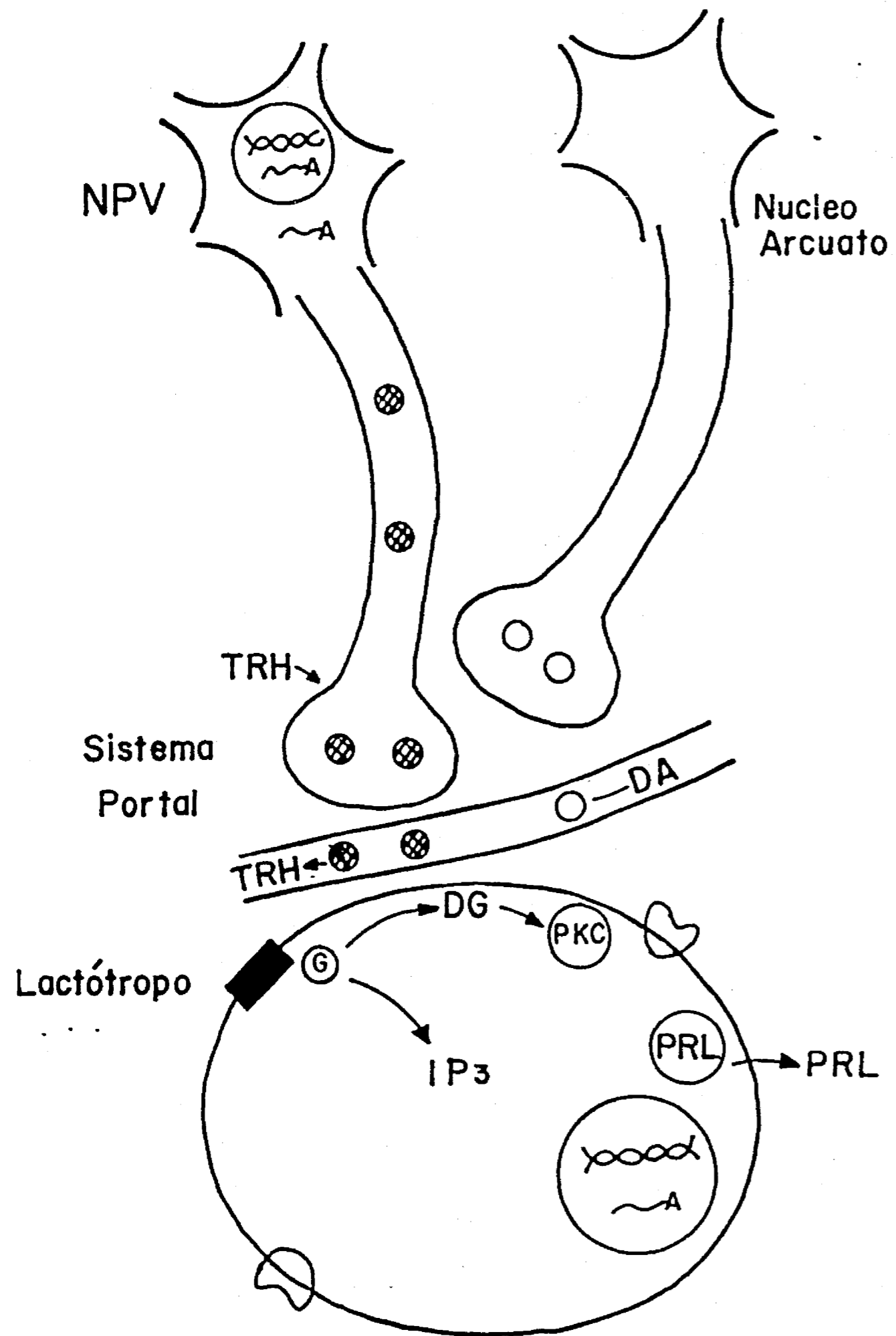
resultados parecen indicar que durante el ciclo estral diferentes mensajeros químicos son los que regulan la biosíntesis y la liberación de TRH. Alternativamente, es posible que el mismo efector actúe en diferentes circunstancias (caracterizadas por diferencias en los niveles de estrógenos por ejemplo) pudiendo afectar así, selectivamente la síntesis o la liberación. El aumento en los niveles del ARNm pudiera ser una preparación de las neuronas TRHérgicas para el momento de la liberación de TRH. Sin embargo, dado que los cambios en el ARNm de TRH fueron medidos en el hipotálamo total no podemos adjudicar la respuesta a un núcleo en particular y es claro que no todos los núcleos que sintetizan TRH en el hipotálamo responden de igual manera a una señal (87). Las hormonas esteroideas (progesterona y estradiol) pueden ser los responsables en el aumento del ARNm de TRH ya que varían de manera importante durante el ciclo. Por el momento, no podemos hablar de regulación directa de éstas sobre el gene de TRH puesto que no se ha demostrado que dichas hormonas regulen la expresión del gene de TRH. Por otro lado, el gene de TRH contiene la secuencia consenso para la unión del receptor de glucocorticoides (73), secuencia idéntica a la que utiliza el receptor de progesterona para regular la expresión génica (106). Estos datos podrían sugerir que durante el ciclo estral los niveles de la progesterona están regulando los niveles del ARNm de TRH, lo que sin embargo queda por demostrarse.

La actividad de PP II en la adenohipófisis es menor en el diestro₂ (y también en el proestro) cuando ocurre el pico de ARNm de TRH en el hipotálamo. Esta relación inversa entre el ARNm de TRH y la PP II adenohipofisiaria ocurre también en el caso de la regulación por hormonas tiroideas (87,90). Los cambios en la PP II adenohipofisiaria en los dos modelos sugieren que pudiera contribuir a definir la concentración efectiva de TRH que llega a la célula blanco (Fig. 18). Como se mencionó anteriormente, los estrógenos modulan negativamente la actividad de la PP II en la adenohipófisis. Sin embargo,

Figura 18

Metabolismo del TRH en el eje hipotálamo-lactótrofo durante el ciclo estral.

En la figura representamos las fluctuaciones observadas en el ARNm de TRH en el hipotálamo, la actividad de la PP II en el órgano blanco, así como las variaciones reportadas en la liberación de TRH, dopamina y prolactina. Los símbolos en la figura representan: \emptyset : moléculas de TRH, O: molécula de dopamina, PKC: proteína cinasa C; DG: diacil glicerol; IP_3 : inositol trifosfato; \blacksquare receptor a TRH acoplado a proteína G; \square : PP II.



ARNm de TRH	↓	↑	↓	↑
Liberación de TRH	↓	↓	↑	↓
Liberación de DA	↑	↑	↓	↑
Actividad de PP II	↑	↓	↑	↑
Liberación de PRL a sangre periférica	↓	↓	↑	↓
	DIESTRO 1	DIESTRO 2	PROESTRO	ESTRO

nuestros resultados no parecen estar de acuerdo con la participación de los estrógenos en los cambios observados, ya que en el diestro 2 los estrógenos están bajos, así como la actividad de la PP II y conforme aumentan en el estro la actividad de la PP II también aumenta. Por tanto, otros mensajeros químicos pueden estar regulando la actividad de la enzima en estas condiciones; resultados preliminares (107) muestran que la actividad de la PP II en adenohipófisis se inhibe por agentes activadores de la proteína cinasa C y el propio TRH.

Lactancia.

Durante la lactancia hay un incremento gradual en PRL sanguínea (nuestros resultados y (102)) al igual que ocurre para el TRH del HMB o de la NH, pero no así para el ARNm de TRH en el NPV. Sabemos que el TRH y la PRL se liberan en respuesta a la succión (59,62,108), por lo que suponemos que existe un aumento en la liberación de TRH durante la lactancia continua que participa en el incremento de la PRL en el suero. También se ha demostrado que la hipófisis se encuentra más sensible a una misma concentración de TRH posterior a un estímulo de succión (50). Por otro lado, observamos que los niveles de ARNm de TRH en el NPV durante la lactancia se mantuvieron constantes y bajos, por lo que el incremento en los niveles de TRH en HMB solo puede explicarse por un aumento en la traducción y/o procesamiento del precursor.

En las etapas finales de la gestación y en el postparto los niveles de ARNm de TRH están elevados mientras que la PRL empieza a elevarse. El TRH en el HMB también se encuentra elevado al final de la gestación, presentando una caída significativa varias horas después del parto. Esta disminución, que probablemente refleja incremento en la liberación de TRH, pudiera estar involucrada en el pico de PRL que se ha observado antes del parto (109). Es interesante notar que los mecanismos que operan sobre la

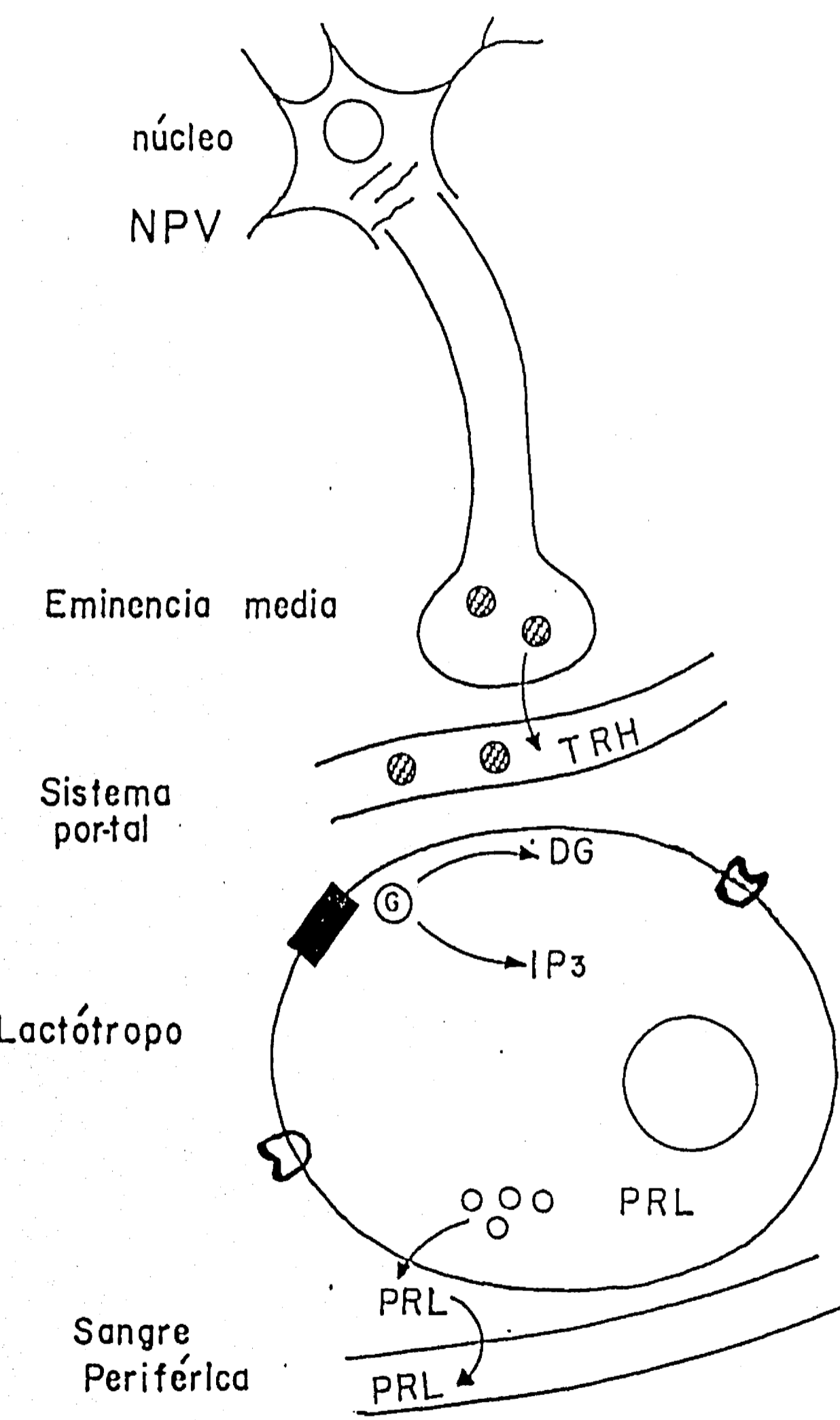
neuronas TRHérgicas al final de la gestación y al inicio de la lactancia, no parecen ser específicos del sistema TRHérgico, ya que se ha visto que los ARNm de otros péptidos como la oxitocina y la vasopresina, que participan importantemente durante el parto y la lactancia están altos en el núcleo supraóptico del hipotálamo (110). ¿A que se deben los cambios en el nivel de ARNm entre el día uno y el día cinco de la lactancia?. Al igual que en el ciclo estral, al final de la gestación y durante la lactancia los niveles de hormonas esteroideas cambian (111), pero no parece haber una relación temporal entre estos cambios y las variaciones del ARNm de TRH. Además, en el NPV del hipotálamo se encuentran pocos receptores para progesterona (112). Mientras que en este núcleo se ha observado una gran cantidad de ARNm para el receptor de glucocorticoides y la coexistencia de éste receptor con el TRH (113), pero los glucocorticoides no cambian de manera significativa (102). También varían los niveles circulantes de hormonas tiroideas, pero los cambios en el ARNm de TRH no correlacionan con los cambios de HT por lo que no parecen ser las responsables del establecimiento de los niveles del ARNm de TRH durante la lactancia (100). Por otro lado, a mitad de la lactancia se ha observado un incremento en la actividad de las deiodasas (comunicación personal con la Dra. Aceves). Esto repercutiría en una mayor concentración local de T_3 en el hipotálamo y posiblemente esto explicaría la disminución en el nivel de ARNm de TRH en el día 5 de la lactancia. Para poder hacer una hipótesis al respecto, es necesario determinar la actividad de estas enzimas durante la gestación y la lactancia en el NPV.

Al destete los niveles del TRH en el HMB y NH disminuyen considerablemente del nivel observado durante la lactancia, mientras que el ARNm de TRH en el NPV permanece constante. No es evidente que la disminución en el contenido de TRH en el HMB se deba a liberación masiva de TRH porque la concentración de PRL en sangre también disminuye. Por lo tanto, esto refleja posiblemente una disminución de la

Figura 19

Metabolismo del TRH en el eje NPV-lactótrofo en el día 18 de la gestación, durante la lactancia y al destete.

En el recuadro se resumen los cambios observados y algunos de los reportados en la literatura. \odot : moléculas de TRH; \circ : moléculas de dopamina; DG; diacil glicerol, IP_3 : inositol trifosfato, PKC: proteína cinasa C; \blacksquare receptor de TRH acoplado a una proteína G, \cup PP II.



ARNm de TRH	—	↓	—
Velocidad de traducción o procesamiento del precursor	?	↑	↓
TRH intraterminal	↓	↑	↓
TRH en el medio extracelular	↑	↗	↘
PP II	?	—	?
Prolactina en sangre	↑	↑	↓

gestación (dia 18) lactancia (dia 1) lactancia (dia 15) destete

traducción o del procesamiento postraducciona del precursor de TRH debida a la interrupción del estímulo. Esto refuerza la hipótesis de que es el procesamiento del precursor de TRH el que se ve principalmente influenciado durante la lactancia (ver resumen de los eventos en la figura 19).

Estímulo de la succión.

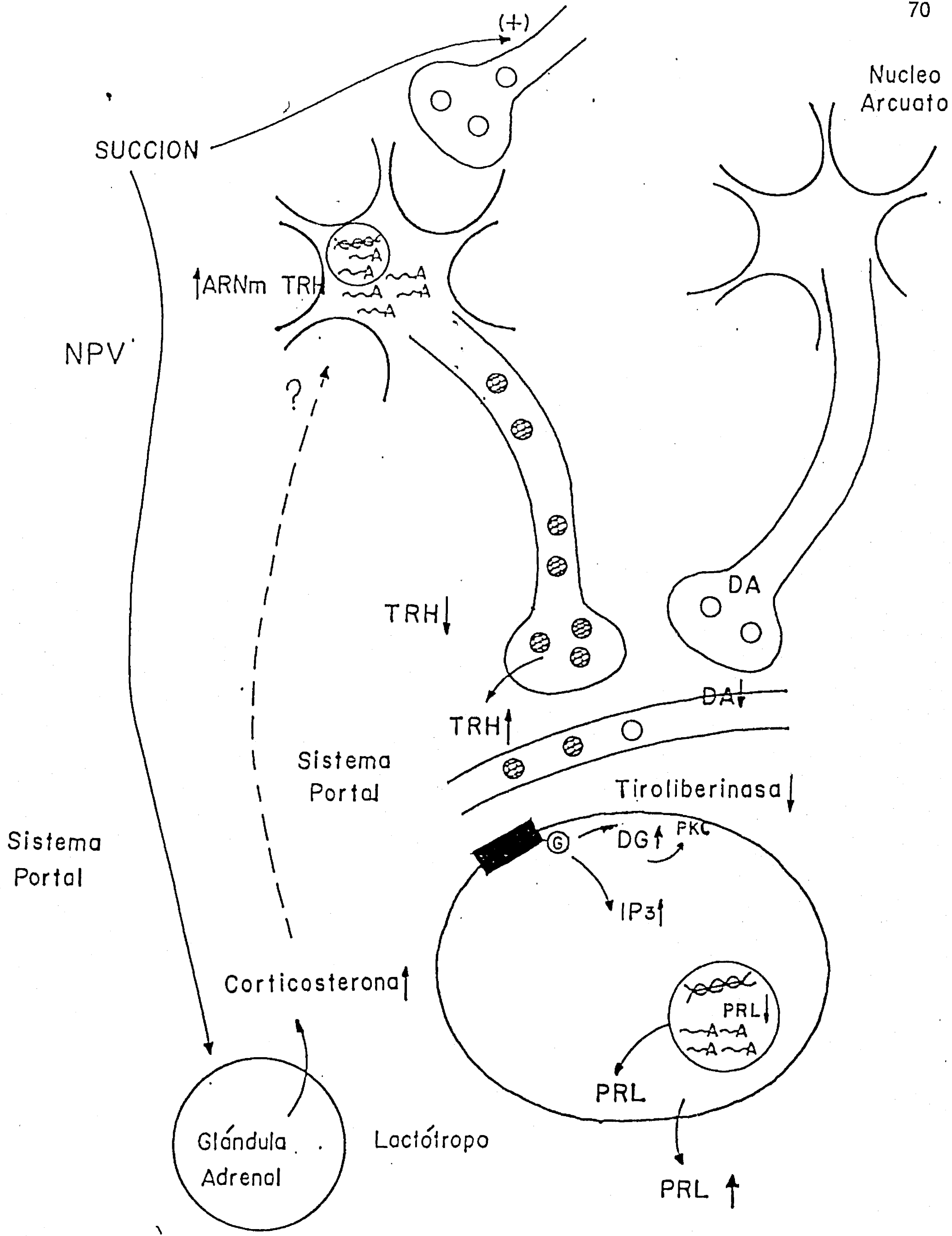
Se ha demostrado que para poder estudiar de manera controlada el estímulo de la succión sobre la liberación de PRL es necesario separar a las crías de la madre por un periodo de 6 a 8 hr; tiempo necesario, para que entre otras cosas, se recuperen las pozas de PRL en la adenohipófisis. Después de 8hr de haber retirado a las crías, los niveles de ARNm de TRH y el TRH en HMB o NH, se mantuvieron similares a los encontrados en las hembras que estuvieron en lactancia continua. Al aplicar el estímulo de la succión hay una liberación de TRH y de PRL (108) que se hace evidente en una disminución significativa de los niveles de TRH en el HMB a los 30 min de succión. A este tiempo se observó un aumento significativo en los niveles de ARNm de TRH en el NPV, aumento que no se observa 30 min después. Nuestros resultados sugieren que el estímulo de la succión incrementa tanto la liberación como la biosíntesis de TRH. Mientras que durante la lactancia continua el contenido de TRH en neurohipófisis sigue los mismos cambios que el HMB, en respuesta a la succión hay un aumento significativo a los 30min contrario a lo observado en el HMB. No es claro aún el papel del TRH presente en la neurohipófisis por lo que es difícil especular sobre este aumento.

La degradación de TRH se encuentra también afectada. Mientras que en la adenohipófisis la PP II se incrementa a las 8 hr sin crías y no se modifica por estímulo de succión, la tiroliberinasa disminuye significativamente a los 15 min. de estímulo recuperándose hasta los 60 min. de succión. Este efecto tan rápido solo puede explicarse si se considera la liberación a la sangre de un inhibidor de la tiroliberinasa.

Figura 20

Cambios iniciales (5 a 30 min) en la actividad metabólica de las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo de ratas, en su inactivación y en la actividad de los lactótopos en respuesta al estímulo de la succión.

Los cambios que se ilustran en la figura se producen cuando después de separar a la madre de sus crías por 8 hrs, se regresan estas y dejamos que succionen a la madre por 30 min. Los simbolos representan: \odot : molécula de TRH; O: moléculas de dopamina (DA); DG: diacil glicerol; IP_3 : inositol trifosfato, PKC: proteína cinasa C.



Hasta el momento, no se ha descrito un inhibidor endógeno para la tiroliberinasasa. Dado que en respuesta a la succión, la disminución en la actividad de la tiroliberinasasa coincide con la posible liberación de TRH podemos sugerir que la inhibición de la actividad de la tiroliberinasasa favorece la acción del TRH sobre el lactótopo.

Cuando alejamos a la madre de sus crías por más de 24 hr los cambios que se observan son parecidos a los que ocurren durante el destete en todos los parámetros determinados; este evento fué independiente de la duración del periodo de lactación (12, 14 o 23 días de lactancia). Esto sugiere que una vez que se retira de manera prolongada (más de 8 horas) el estímulo de la succión, ocurren cambios en los mecanismos intracelulares que están involucrados en la regulación del metabolismo del TRH entre otros eventos y en particular se reduce la tasa de traducción o procesamiento postraduccional del precursor de TRH.

La rapidez en las respuestas en el modelo de la succión sugieren que el metabolismo del TRH puede estar regulado por efectores transsinápticos. A este respecto, se ha descrito que la interrupción de las vías serotoninérgicas que llegan al hipotálamo inhibe la liberación de PRL en respuesta a la succión (114). Sin embargo, hasta el momento no podemos descartar una influencia hormonal. Por ejemplo, los glucocorticoides se liberan en respuesta a la succión y los receptores para estas hormonas coexisten con el TRH en el NPV (ver resumen en la figura 20).

Estrés por frío.

En respuesta al frío hay un aumento en el metabolismo celular a consecuencia del aumento en los niveles de hormonas tiroideas en sangre. La causa de este aumento se debe a la liberación del TRH de la eminencia media que induce la liberación de TSH (54). En este modelo experimental, se ha descrito que el TRH además de participar

Hasta el momento, no se ha descrito un inhibidor endógeno para la tiroliberinasa. Dado que en respuesta a la succión, la disminución en la actividad de la tiroliberinasa coincide con la posible liberación de TRH podemos sugerir que la inhibición de la actividad de la tiroliberinasa favorece la acción del TRH sobre el lactótopo.

Cuando alejamos a la madre de sus crías por más de 24 hr los cambios que se observan son parecidos a los que ocurren durante el destete en todos los parámetros determinados; este evento fué independiente de la duración del periodo de lactación (12, 14 o 23 días de lactancia). Esto sugiere que una vez que se retira de manera prolongada (más de 8 horas) el estímulo de la succión, ocurren cambios en los mecanismos intracelulares que están involucrados en la regulación del metabolismo del TRH entre otros eventos y en particular se reduce la tasa de traducción o procesamiento postraduccional del precursor de TRH.

La rapidez en las respuestas en el modelo de la succión sugieren que el metabolismo del TRH puede estar regulado por efectores transsinápticos. A este respecto, se ha descrito que la interrupción de las vías serotoninérgicas que llegan al hipotálamo inhibe la liberación de PRL en respuesta a la succión (114). Sin embargo, hasta el momento no podemos descartar una influencia hormonal. Por ejemplo, los glucocorticoides se liberan en respuesta a la succión y los receptores para estas hormonas coexisten con el TRH en el NPV (ver resumen en la figura 20).

Estrés por frío.

En respuesta al frío hay un aumento en el metabolismo celular a consecuencia del aumento en los niveles de hormonas tiroideas en sangre. La causa de este aumento se debe a la liberación del TRH de la eminencia media que induce la liberación de TSH (54). En este modelo experimental, se ha descrito que el TRH además de participar

como neurohormona, modula la actividad de neuronas que participan en la termorregulación como son las del area preóptica/hipotálamo anterior. En base a esto, decidimos estudiar la biosíntesis del TRH tanto en el NPV-HMB como en el AP/HA. Se estudiaron dos tipos de cinéticas, tiempos cortos o largos con el fin de distinguir entre un efecto neural y uno hormonal dado el posible efecto retroalimentador de las hormonas tiroideas (87).

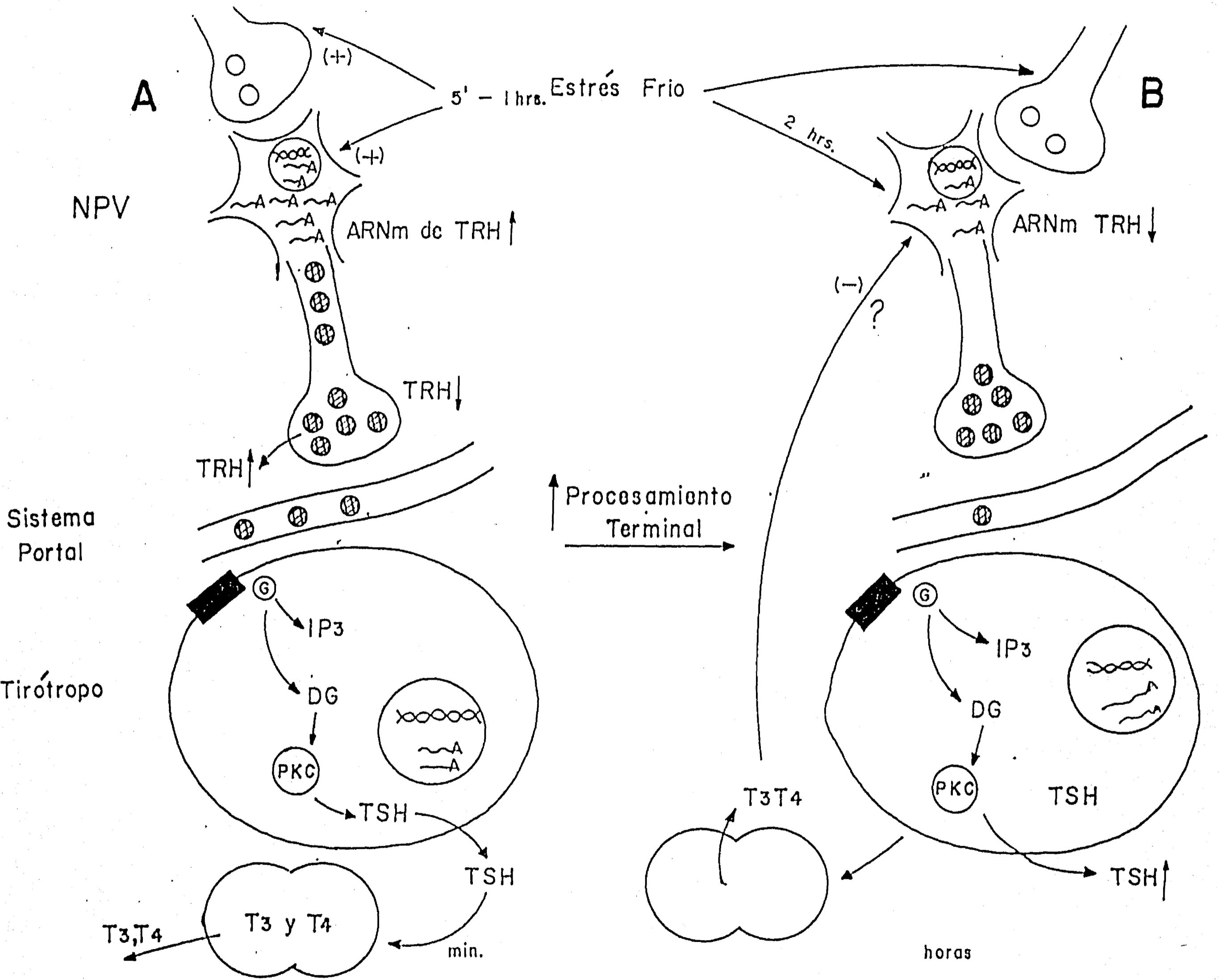
Un aumento de la liberación de TRH de la eminencia media (53) explica probablemente la disminución que observamos en el TRH del HMB a los 5 min de exposición al frio. A partir de los 10 min hasta las 2 horas de exposición al frio los niveles de TRH se mantuvieron iguales que el control. Esto sugiere que existen eventos a corto plazo que repletan las posas de TRH en la terminal nerviosa, como ya se había observado en ensayos in vitro. Posiblemente se activa rápidamente el procesamiento postraduccional en las terminales nerviosas.

Como en respuesta a la succión, los niveles del ARNm de TRH en el NPV y AP/HA presentan una respuesta rápida, encontrándose altos entre los 30-60 min. de exposición al frio. A las 2 hr ya no hay diferencia con los controles y solo en el AP/HA hay una respuesta estimuladora a las 6 hr de exposición al frio. En el NPV, la falta de respuesta a tiempos largos de exposición pudiera deberse a un efecto retroalimentador de las hormonas tiroideas que disminuyen los niveles de ARNm solo en éste núcleo (87). Cambios rápidos en el nivel de ARNms se han demostrado en los genes de inducción rápida tales como cfos (27). Los niveles de los ARNms de diversos péptidos (como vasopresina y encefalinas) se ven incrementados por activación a nivel transcripcional 4 o 6 horas después del estímulo (38, 115, 116), y los niveles se mantienen altos hasta 24 hr después. Por lo tanto, al igual que en la succión la respuesta rápida pudiera deberse a una estabilización del ARNm de TRH. Mientras que la respuesta tardía puede corresponder a un aumento en la transcripción del gene de TRH. Esta respuesta

Figura 21

Influencia de la exposición al frío sobre el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides.

En la figura se ilustran los cambios metabólicos que ocurren en las células del eje tiroideo en dos momentos diferentes después de aplicar el estímulo. a) Entro los 5 min y 1 hr de estímulo ocurren varios eventos en la neurona TRHérgica del NPV del hipotálamo. A los 5 min disminuye el contenido de TRH del HMB por un aumento en la liberación de TRH a la sangre portal. Este incremento correlaciona con un aumento de TSH en sangre. Más tarde (30 min-1 hr) los niveles de ARNm de TRH se encrementan. B) A las 2 hrs de exposición al frío el ARNm de TRH disminuye al nivel del control, al tiempo que la TSH y hormonas tiroideas se encuentran elevados en sangre. \odot : moléculas de TRH, IP_3 : inositol trifosfato; DG: diacil glicerol; PKC: proteína cinasa C; \blacksquare_{\odot} : receptor de TRH acoplado a proteína G.



transitoria sobre el ARNm pudiera deberse a un efector de vida media corta, en respuesta a la transmisión nerviosa responsable de la liberación del TRH. Sin embargo, otros autores han reportado un aumento en los niveles de ARNm de diferentes péptidos por estímulos nerviosos a tiempos mas largos (116,117) (ver resumen en la figura 21).

Regulación del metabolismo del TRH.

En resumen, observamos que diferentes etapas del metabolismo de TRH estan reguladas durante las condiciones fisiológicas probadas y que dos tipos de neuronas TRHérgicas diferentes responden de manera diferencial a un estímulo dado. Durante la lactancia continua es probable que no se observen cambios en los niveles del ARNm de TRH en el NPV porque la succión induce solo cambios transitorios que pudieran deberse a la estabilización momentanea del ARNm de TRH. Se ha descrito que la estabilización de algunos ARNm ocurre en segundos (118,119), ya sea por interacción con los ribosomas o con proteínas involucradas en la estabilización del ARNm (41). Por otro lado, en el caso de ARN mensajeros transitorios como para los genes *c-fos* y *c-Jun*, y para las proteínas que se producen en respuesta a temperaturas elevadas, se han observado cambios a nivel transcripcional en tiempos muy cortos (27,109). En nuestras condiciones no observamos la aparición de bandas de mayor peso molecular, lo que implicaría que el incremento en el ARNm de TRH, ya sea en respuesta al estímulo de la succión o por exposición al frio en tiempos cortos, este relacionado con mecanismos que involucran estabilización del ARNm. Sin embargo, para poder descartar un efecto a nivel transcripcional es necesario determinar la tasa transcripcional del gene de TRH en estas condiciones. El aumento en la velocidad de síntesis del TRH durante la lactancia sin cambios en el nivel del ARNm, sugiere un aumento en la actividad traduccional o mayor

procesamiento del precursor, lo cual involucraría un aumento en la actividad de las enzimas procesadoras en esta condición. Se ha demostrado que la carboxipeptidasa E, las kalikreinas y la PAM aumentan su actividad en respuesta a cambios en AMPc y hormonas esteroideas (12,43,120). Durante la lactancia existen cambios en las concentraciones de hormonas tiroideas (100) y esteroideas (111) que pudieran ser responsables de incrementar la traducción o el procesamiento del precursor de TRH. En la presentación de dos estímulos agudos (succión y frío) que inducen liberación de TRH del HMB, observamos que la biosíntesis tanto a nivel del ARNm como la velocidad del procesamiento de TRH en la terminal están acoplados con la liberación (Fig. 22). Esto permite a la célula mantener la concentración de TRH necesaria para poder responder a un nuevo estímulo.

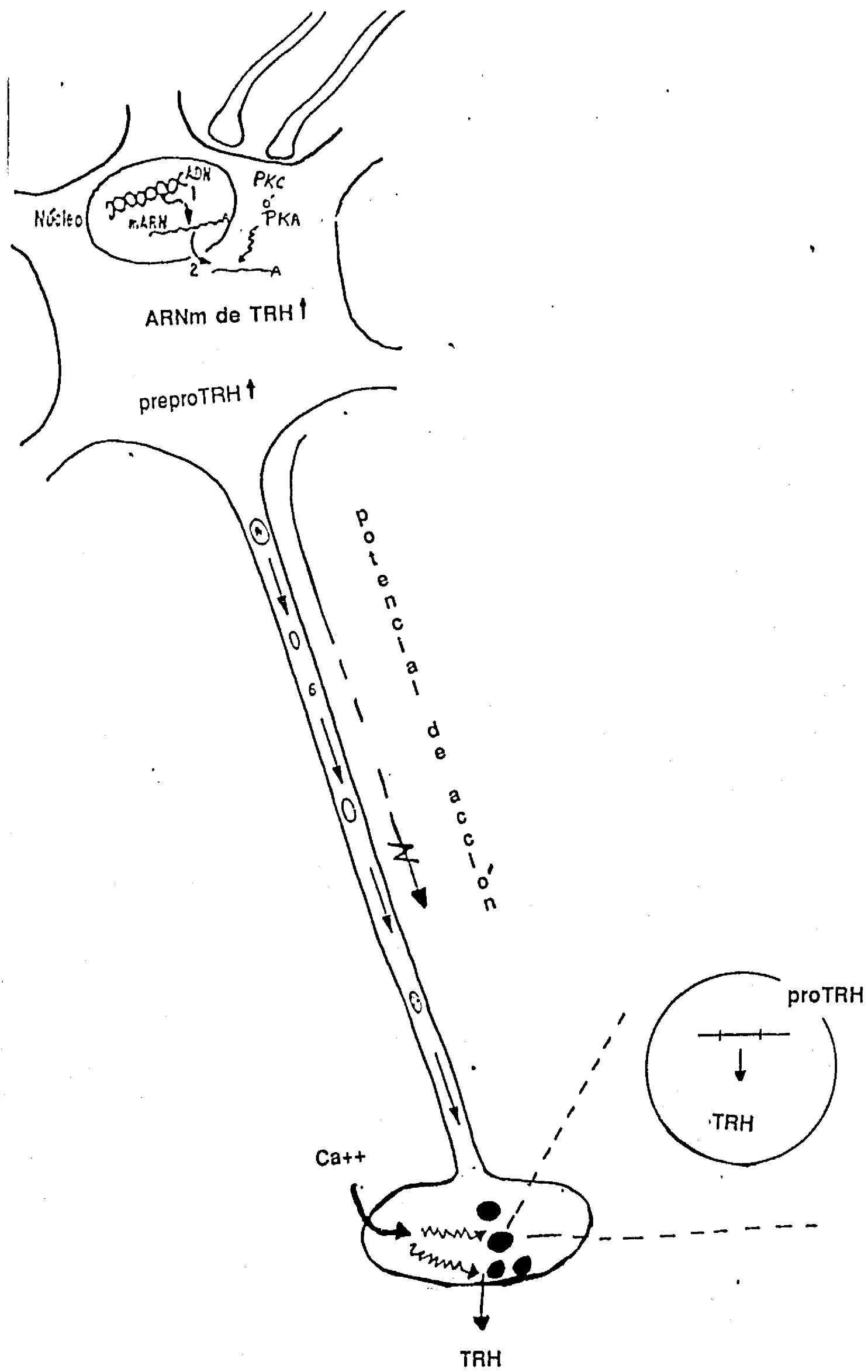
La actividad de la tiroliberinasa en la sangre portal y de la PP II en el órgano blanco parecen variar de acuerdo a la concentración activa de TRH requerida. Así, durante el ciclo estral la baja actividad de la PP II en el D₂ y proestro facilita el efecto de TRH, mientras que en hembras lactantes que se mantienen con succión la actividad es menor que cuando se quitan las crías. Los cambios en la tiroliberinasa en respuesta a la succión no pueden explicarse fácilmente. Pero la inhibición de su actividad correlaciona con una mayor liberación de TRH a sangre portal, lo que supondría que este cambio facilita la acción de TRH sobre el órgano blanco.

En los estímulos agudos que empleamos para activar a la neurona TRHérgica, se han involucrado a neurotransmisores como la noradrenalina para el caso del frío, y a la serotonina en la respuesta a la succión (114, 121). El tipo de respuestas en el metabolismo de TRH bajo estas circunstancias parece estar de acuerdo con una activación por medio de transmisión nerviosa. Sin embargo, se sabe que las hormonas del tipo de los glucocorticoides pueden regular la estabilidad del ARNm de péptidos, la actividad de las enzimas involucradas en el procesamiento, así como la actividad de las

Figura 22

Cambios en el metabolismo de TRH en respuesta a estímulos neurales.

En la figura se resumen los cambios en el metabolismo de TRH que hemos observado en respuesta a diferentes estímulos neurales (estrés por frío, succión y depolarización). Aumento en los niveles de ARNm, el procesamiento intraterminal y la liberación de TRH.



proteínas G (122) que están directamente involucradas en la transmisión de señales por neurotransmisores, por lo que no podemos descartar que los cambios observados en la corticosterona pudieran estar también involucrados en la respuesta. También se ha observado que este tipo de hormonas tienen efectos sobre la actividad eléctrica de las membranas (123). Por lo que en este momento no podemos inferir cuál es el tipo de mensajero químico que modula el metabolismo de TRH en cada una de las condiciones estudiadas. Es posible que en una condición dada la neurona TRHérgica pueda responder a varios tipos de señales extracelulares. Esto es muy importante puesto que le permitiría hacer un balance entre diferentes mensajes que reflejan el estado fisiológico del organismo, repercutiendo directamente en el mantenimiento de los niveles intracelulares de la forma liberable de péptido.

CONCLUSIONES

En este trabajo nosotros encontramos que el metabolismo de TRH se regula en tres condiciones experimentales como son: la exposición al frío, la lactancia (continua y succión) y el ciclo estral. Demostramos que la activación de las neuronas TRHérgicas no solo induce un cambio rápido de la liberación del péptido, sino también en el procesamiento intraterminal del péptido, los niveles de su ARNm y su inactivación extracelular. Además observamos, que los cambios en el metabolismo del TRH generalmente están en función de controlar la concentración efectiva de TRH que llega al órgano blanco.

Varias de las etapas del metabolismo del TRH parecen también estar sometidas a eventos regulatorios a más largo plazo (horas o días).

Por otro lado nuestros datos son consistentes con la hipótesis de que las neuronas TRHérgicas del NPV se activan en condiciones en las cuales ocurre liberación de PRL o TSH y que las del AP/HA están involucradas en la termoregulación.

Finalmente, si bien no podemos concluir cuáles son los mecanismos intracelulares y los mensajeros químicos involucrados, los resultados nos permiten inferir cuáles serían algunos de los más probables.

ANEXO 1

Some Events of TRH Metabolism are Regulated in Lactating and
Cycling Rats

Rosa Maria Uribe, Patricia Joseph-Bravo, Jorge Pasten, Georgina Ponce, Milagros Méndez, Luis Covarrubias and Jean-Louis Charli.

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, MEXICO.

Running title: in vivo regulation of TRH metabolism

key words: TRH; TRH mRNA; pyroglutamyl peptidase II; lactation; estrous cycle; post-translational processing; translational efficiency.

Acknowledgments: We are very grateful to Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera for helpful discussions, to Dr. Claude Kordon for facilitating us the PRL assay reagents and Elizabeth Mata, and Sergio González for technical assistance. Supported in part by grants from CONACYT (PCEXCNA-051014) and European Economic Community (CI-0356-F).

EE-56-21
v/v/

Abstract. Levels of TRH, TRH mRNA, and pyroglutamyl peptidase II, were analyzed in the hypothalamus-adenohypophysial axis during lactation and estrous cycle. Mediobasal hypothalamic levels of TRH, dropped 41% ($p < 0.01$) from pregnancy levels (taken as 100%) at first day of lactation, recovering until day 15 to the values observed at pregnancy. A sharp decrease was also observed during weaning (36%, $p < 0.01$ compared to last day of lactation). TRH levels in the neurohypophysis increased during lactation and dropped at weaning. Highest TRH mRNA levels in paraventricular nucleus were found at end of pregnancy and beginning of lactation; they decreased 37% ($p < 0.05$) at day 5 of lactation and stayed constant thereafter. Pyroglutamyl peptidase II adenohypophyseal activity was not modified during lactation, but changed during estrous cycle. Relative to estrous values activity it diminished 58% ($p < 0.05$) at 10:00 h (57% at 14:00 h) during diestrus 2 and 27% at 10:00 h (37% at 14:00 h) during proestrus. Hypothalamic TRH mRNA levels fluctuated in opposite manner to adenohypophyseal pyroglutamyl peptidase II during estrous cycle with a peak at diestrus 2: 183% of estrous value ($p < 0.05$). These data point for regulation of TRH metabolism in conditions where prolactin secretion fluctuates. They also suggest a sharp release of TRH between the end of pregnancy and the first day of lactation and, that translational efficiency or post-translational processing of TRH precursor in the paraventricular neurons (projecting to median eminence) increases during lactation and drops at weaning, concomitantly with PRL secretion.

Introduction

In vivo regulation of thyrotropin releasing hormone (TRH) metabolism and secretion in the hypothalamo-hypophyseal axis has been mainly studied determining TRH levels in median eminence, in push-pull perfusates or, portal blood [1,2]. Additional methods for studying TRH metabolism are also available. Levels of mRNA for endocrine peptides are in some instances elevated when peptide secretion increases [3]; therefore TRH mRNA levels can indicate the state of activity of TRH neurons. In addition, variations of pyroglutamate amino peptidase II (PP II) activity, a TRH specific peptidase [4] localized on lactotrophs [5], might affect TRH efficiency on target cells. TRH metabolism is regulated by the thyroid state of the animal in a region specific manner. Thyroid hormones (TH) down regulate the levels of TRH mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) [6] while they up regulate PP II activity in adenohypophysis [7]. Oestradiol 17β (E_2) reduces adenohypophyseal PP II activity [8].

Prolactin (PRL) secretion from adenohypophysis is under tonic dopaminergic inhibition [9]. TRH is one of several factors controlling release of PRL from adenohypophysis in the rat. In vitro and in vivo studies have shown that it stimulates PRL release and synthesis [10]. Its efficiency depends on previous dopaminergic activity, i.e. a transient decrease of the dopaminergic tone is necessary to induce transformation of PRL into a pool releasable by TRH stimulation [11]. Serum PRL concentrations are correlated with variations in stalk blood TRH during lactation or estrous cycle [12,13]. For example, during late proestrus, TRH levels are high in portal blood relative to those found in the morning of proestrus [1]. Passive

immunization with anti-TRH antisera induces partial inhibition of suckling-induced PRL release and PRL release at proestrus [14,15]. There are however, reports contradicting TRH involvement on PRL release [16,17]. In the present study we show that TRH and its mRNA fluctuate during lactation and that, during estrous cycle, TRH mRNA level and adenohipophyseal extracellular degradation are regulated.

Materials and Methods

Animals

Wistar rats fed ad libitum and maintained in a 12 hrs light-dark period (light on at 7:00) were used. Animals were killed by decapitation. Hypothalami (including preoptic area), mediobasal hypothalami (MBH; median eminence plus ventral part of arcuate nucleus), neurohypophysis, adenohipophysis, and sera were immediately collected and kept at -70 °C until assayed. For PVN area dissection, HMB was dissected, brains frozen on dry ice and 1.5 mm coronal slice containing the entire PVN was cut with razor blades. PVN area dorsal margin was defined by the fornices. Three groups of animals were used:

a) a group of 7 rats in their 18th day of pregnancy was killed between 11:00 and 12:00 hrs;

b) 135 primiparous lactating rats, each with a litter of eight pups, were housed in individual cages. Each lactating rat was sacrificed between 11:00 and 12:00 hrs at the indicated day of lactation, and at weaning, i.e. 24 hrs after separating pups from the mother, at day 23;

c) 196 rats on different days of their estrous cycle were screened between 9:00 and 10:00 hrs or between 12:00 and 13:00 by vaginal smears. Rats were only used when showing three consecutive cycles of 4 days each. They were sacrificed between 10:00-11:00 or 14:00-15:00 hrs.

RNA isolation

Cytoplasmic RNA from hypothalami was extracted for analysis of estrous cycle samples. Total cellular RNA from PVN was extracted for pregnancy and lactation samples.

Cytoplasmic RNA was extracted as previously described [18]. Each hypothalamus was homogenized in 200 μ l 50mM Tris-HCl pH 7.4, 25mM NaCl, 5mM MgCl₂; 8 μ l of 25% Triton X-100 and 100 μ l of 72% sucrose 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. Extraction efficiency was 3 μ g RNA/mg protein. Total cellular RNA was isolated as cytoplasmic RNA but water, instead of sucrose solution, was used for homogenate dilution. In this case extraction efficiency was 1.3 μ g RNA/mg tissue.

Northern blot hybridization

5-10 ug RNA were electrophoresed in minigels (2.2 M formaldehyde, 1% agarose and 10 mM phosphate buffer pH 7.0). Following electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide (4 ug/ml) for 5 min., destained for 6-8 hrs with water, and photographed with UV transillumination for RNA quantification. Loaded samples were transferred to nitrocellulose membrane for 24 to 36 hrs using 20 x SSC; the membranes were then baked for 2 hrs at 80 °C. Hybridizations were performed as described [18] using the rat cDNA as probe [19]. Ribosomal RNA (stained with ethidium bromide) and TRH mRNA autoradiographic bands were quantified by laser densitometry (Biomed Instruments, Fullerton, CA.). TRH mRNA levels were normalized to rRNA amount.

TRH and PRL radioimmunoassays

TRH was quantified according to Joseph-Bravo et al, 1979 [20]. Sensitivity of assay (90% B/B0) was 10 pg; intraassay and interassays variations were 6 and 10% respectively. PRL radioimmunoassay was performed as Enjalbert et al, 1980 [21]. Rat PRL RP3 reference preparation (NIDDK-NIH) was used. Inter and intraassay variabilities were below 15%.

Determination of adenohipophysial PP II and serum thyroliberinase activities

Pools of 5 adenohipophysis were sonicated in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (10% w/v), centrifuged at 1000 g for 15 min and supernatants centrifuged at 12 000 g for 15 min. Pellets were used to measure PP II activity as described [7]. Membranes

were preincubated (5min) at 37 °C in 50mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 2.5 mM bacitracin and N-ethylmaleimide (final concentrations) and incubated at 37 °C with 100 000 cpm of [³H-pro]TRH (New England Nuclear) (10⁻⁶ M final concentration) in 50 ul final volume. Five microliter aliquots were taken at the beginning and during incubation (up to 1 hour) and spotted into cellulose phosphate paper (Whatman P81). Ascending chromatography was developed in 1M acetic acid. After drying the paper, the first cm was cut, [³H-pro] hisproNH₂ eluted and counted. Zero time values were subtracted from other time values and each determinations made in duplicate. Thyroliberinase activity was measured as described for PP II except that serum was diluted 1:3 with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4. Activities were linear during incubation.

Protein determination

Proteins were quantified according to Lowry et al, 1951 [22].

Statistical analysis

Analysis of variance followed by Least significant difference multiple comparison test was performed. Significance was determined at p<0.05 or less.

RESULTS

TRH, TRH mRNA, PP II and serum thyroliberinase at day 18 of pregnancy, during lactation, and at weaning

Serum PRL concentration augmented during lactation and decreased at weaning to pregnancy levels (Fig 1) as previously reported [23]. Mediobasal hypothalamic levels of TRH dropped 41% ($p < 0.01$ compared to day 18 of pregnancy (=100%)) at first day of lactation, increasing back to pregnancy levels at day 15; a sharp fall (36%, $p < 0.01$ compared with day 15 of lactation) was also observed 24 hr after weaning (Fig 1). Levels of TRH in neurohypophysis, increased until day 10 of lactation and decreased thereafter; however these variations were not significant (Table 1). Highest TRH mRNA levels in PVN were found at the end of pregnancy and first day of lactation, and diminished 37% ($p < 0.05$) at day 5 of lactation, remaining at this level until weaning (Fig 2). Adenohypophyseal PP II and thyroliberinase activities were not modified during lactation (Table 2).

TRH mRNA, PP II and serum thyroliberinase in estrous cycle

During estrous cycle, TRH mRNA levels and PP II activity fluctuated. Hypothalamic TRH mRNA levels (assayed between 14:00 and 15:00 h) augmented to 183% ($p < 0.05$) at diestrus 2 with respect to estrous levels (Fig 3). Adenohypophyseal PP II (assayed between 10:00-11:00 h) lowest levels were found at diestrus 2 and proestrus with decreases of 58% ($p < 0.05$) and 27% respectively as compared with estrous values (Fig 4). A similar pattern of activity was observed at 14:00-15:00 h (with decreases of 58% and 37% respectively) although these differences were not significant (Fig. 4). In contrast, thyroliberinase activity assayed

either in the morning or the afternoon did not vary during the estrous cycle (not shown).

DISCUSSION

This work shows regulation of some TRH metabolic steps during lactation and estrous cycle. Comparison of the levels of TRH in MBH with its mRNA in PVN, where originate most of the TRH neurons that innervate the median eminence [24], demonstrates no correlation between these two parameters during lactation. Steady state TRH levels in MBH could a priori be set by TRH biosynthesis, release or degradation rates. However, we have previously shown that, prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptidase I, two intracellular enzymes able to degrade TRH in vitro, do not participate in TRH catabolism in whole cells [25]. Therefore, the steady state levels in MBH are probably the result of biosynthesis and release. Changes in TRH levels could be due to variations of one of these two metabolic events or to their combined effect. Various studies have shown that, in neuroendocrine cells, peptide mRNA levels can fluctuate coordinately with secretion rates [3]. In particular high supraoptic nucleus vasopressin and oxytocin (OXT) mRNA levels during lactation correlate with high plasma peptide levels [26].

With this background we can tentatively interpret the data showing decrease of TRH levels between end of pregnancy and beginning of lactation as an increase of TRH secretion at this moment since TRH mRNA levels did not drop concomitantly. This is consistent with the blood PRL augmentation occurring at this moment. This postulated variation of TRH secretion coincide with the OXT release occurring at birth

[27] and may participate in the PRL surge that precedes parturition [28].

Stable TRH mRNA levels starting at day 5 of lactation are accompanied by increased MBH TRH levels until day 15, suggesting that TRH secretion from median eminence during lactation is not as high as at the beginning. However, it has been shown that suckling stimulates TRH release [13] and during days 5-15 of lactation plasma PRL is also increased ([23], and this work); the rise observed in TRH levels is thus best explained if post-nuclear events (processing of precursor or translational efficiency) are stimulated. In this regard, although still scarce, there is evidence for regulation of translation efficiency by steroids [29] and for activation of processing enzymes such as peptidyl-glycine α amidating monooxygenase (PAM), carboxypeptidase E and kallikrein by hormones or second messengers [30]. We have previously suggested that a post-translational step is increased to maintain TRH levels in the terminal upon stimulation of peptide release *in vitro* [31]. Increase in translational efficiency or TRH precursor processing may be necessary to maintain high TRH levels in the terminal for its release during suckling [13], as a consequence of a continuous activation of TRH neurons. Changes of TRH levels between day 15 of lactation and weaning suggest that mRNA levels are not regulated by the interruption of the stimulus as might be the reduction on TRH precursor processing.

The parallel changes occurring between the postulated post-nuclear events and PRL levels make it tempting to suggest that intensification of TRH secretion during lactation is one of the factors setting PRL levels during these physiological events.

The pattern of TRH levels in neurohypophysis or MBH suggest different roles and/or regulation for these tissues. However, in each tissue, levels did increase at the beginning of lactation and decreased at weaning. The post-nuclear mechanisms operating during lactation may be similarly altered in the two projections.

We previously noted a coordinated regulation of TRH mRNA levels in hypothalamus during the circadian cycle [18]. Levels of hypothalamic TRH mRNA during estrous cycle cannot be compared with TRH levels because they are the mean fluctuations from various nuclei. Due to their amplitude it is possible that TRH mRNA in several nuclei, including PVN, are regulated coordinately by variations of steroid levels. If so, high diestrous 2 TRH mRNA levels may indicate a build up of TRH in preparation for the preovulatory TRH and PRL surge. On the other hand, lower PP II levels during diestrous 2 and proestrus may be necessary to increase TRH efficiency. This inverse relationship between PP II and TRH mRNA is similar to that observed when thyroid hormone (TH) levels are altered [6,7].

Although TRH gene has consensus sequences for thyroid hormones and glucocorticoids receptors [32], glucocorticoids do not change during gestation or lactation [23] and, TH diminish during lactation [33]. Other hormonal or transneuronal activators may therefore participate either in transcription or mRNA stability. In this regard, we have found that intracellular second messengers can regulate TRH mRNA in hypothalamic cells in vitro (Ma.L. Covarrubias, L. Covarrubias, J.L. Charli and P. Joseph-Bravo, in preparation).

Adenohypophyseal PP II is increased by TH and decreased by 17β oestradiol [7-8]. The fluctuations observed during estrous cycle are not in phase with estradiol

levels suggesting either a 24 h delay for E_2 effect or the involvement of yet unknown factors in setting PPII activity. These data point for involvement of PP II in regulation of PRL secretion.

In conclusion, the data demonstrate that various steps in TRH metabolism are regulated when PRL secretion is altered. Discrepancy between MBH TRH and PVN TRH mRNA levels during lactation indicate that a surge of TRH secretion can occur between end of gestation and beginning of lactation and suggest that translational efficiency or post-translational processing of TRH precursor in the PVN increases during lactation and drops at weaning. These modifications on post-nuclear events are paralleled by variations of blood PRL.

Table 1. TRH levels in neurohypophysis during lactation

Days	TRH
18 P	65 ± 5
5 L	90 ± 21
10 L	137 ± 21
15 L	115 ± 21
weaning	71 ± 22

Data (pg TRH / neurohypophysis) are Mean ± SEM of 3 independent determinations. P=pregnancy; L=lactation.

Table 2. Specific activities of adenohipophysial PP II and serum thyroliberinase during lactation.

Days of lactation	Adenohipophysial pyroglutamate aminopeptidase II ^a	Thyroliberinase ^a
1	0.052 ± 0.007	0.25 ± 0.022
4	0.049 ± 0.007	0.20 ± 0.010
11	0.056 ± 0.011	0.22 ± 0.026
22	0.050 ± 0.014	0.19 ± 0.042
29	0.056 ± 0.023	0.29 ± 0.020

In this experiment, in contrast to what is shown in figures 1, 2, and table 1, rats were maintained with their pups for up to 29 days. Data are mean ± SEM of 4 (PPII) and 3 (thyroliberinase) independent determinations. ^a Specific activities in pmoles hisproNH₂ / min / mg protein.

Figure legends

Fig.1. Serum PRL (upper panel) and mediobasal hypothalamic TRH levels (lower panel), from day 18 of pregnant rat (P), during lactation and at weaning (W). Number of rats are shown within the figure columns. The data represent the mean \pm SEM. Statistical significance, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$.

Fig.2. PVN TRH mRNA levels in day 18 of pregnancy (P), at 1, 5, 10 and 15 days of lactation and at weaning (W). A) representative samples of Northern blots from total RNA hybridized with TRH cDNA (upper panel) and its corresponding total RNA stained with ethidium bromide (lower panel). B) densitometric analyses of TRH mRNA adjusted per amount of ribosomal RNA. The data represent the mean of arbitrary units \pm SEM. Number of samples in the columns. Statistical significance, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.02$, ***: $p < 0.01$.

Fig.3. Hypothalamic TRH mRNA levels in cycling rats sacrificed between 14:00-15:00. D₁ = diestrous 1, D₂ = diestrous 2, P = proestrus, E = estrous. A) Representative samples of northern blots from cytoplasmic RNA hybridized with TRH cDNA (upper panel). Lower panel shows corresponding cytoplasmic RNA stained with ethidium bromide. B) densitometric analyses of TRH mRNA adjusted per amount of ribosomal RNA. Data (mean \pm SEM) are expressed in percentage of estrous values. Numbers of samples are shown in the columns. Statistical significance, *: $p < 0.05$.

Fig.4. Adenohypophysial PP II activity during the rat estrous cycle. Activity was measured between 10:00 and 11:00 and between 14:00 and 15:00. Data are the mean \pm SEM of the number of samples shown in columns. Statistical significance, *: $p < 0.05$.

References

- 1 Mori M, Yamada M: Thyroid hormones regulate the amount of thyrotrophin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. *J Endocrinol* 1987;114:443-448.
- 2 Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H: Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 1983;37:225-228.
- 3 Elkabes S, Loh YP: Effect of salt loading on proopiomelanocortin (POMC) messenger ribonucleic acid levels, POMC biosynthesis, and secretion of POMC products in the mouse pituitary gland. *Endocrinology* 1988;123:1754-1760.
- 4 Wilk S: Neuropeptide specific peptidase: Does brain contain a specific TRH degrading enzyme?. *Life Sci* 1986;39:1487-1492.
- 5 Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, and Denef C: Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 1990;127:1224-1233.
- 6 Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM: Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 1987;238:78-80.
- 7 Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P: Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988;48:211-213.

- 8 Bauer K: Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 1988;70:69-74.
- 9 De Greef WJ, Plotsky PM, Neill JD: Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 1981;32:229-233.
- 10 Leong DA, Frawley LS, Neill JD: Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann Rev Physiol* 1983;45:109-127.
- 11 Grosvenor CE, Mena F: Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin the lactating rat. *Endocrinology* 1980;107:863-868.
- 50- 12 Fink G, Koch Y, Aroya NB: Release of thyrotropin releasing hormone into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res* 1982;243:186-189.
- 13 De Greef WJ, Visser TJ: Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocrinol* 1981;91:213-223.
- 14 De Greef WJ, Voogt JL, Visser TJ, Lamberts SWJ, Van der Schoot P: Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology* 1987;121:316-322.
- 15 Horn AM, Fraser HM, Fink G: Effects of antiserum to thyrotrophin-releasing hormone on the concentrations of plasma prolactin, thyrotrophin and LH in the pro-estrous rat. *J Endocrinol* 1985;104:205-209.

- 16 Rõndeel JMM, De Greef WJ, Visser TJ, Voogt JL: Effect of suckling on the in vivo release of thyrotropin-releasing hormone, dopamine and adrenaline in the lactating rat. *Neuroendocrinology* 1988;48:93-96.
- 17 Sheward WJ, Fraser HM, Fink G: Effect of immunoneutralization of thyrotrophin-releasing hormone on the release of thyrotrophin and prolactin during suckling or in response to electrical stimulation of the hypothalamus in the anaesthetized rat. *J Endocrinol* 1985;106:113-119.
- 18 Covarrubias L, Uribe RM, Méndez M, Charli JL, Joseph-Bravo P: Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochem Biophys Res Comm* 1988;151:615-622.
- 19 Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH: Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 1986;231:159-161.
- 20 Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, and Kordon C: Effects of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1979;104:801-806.
- 21 Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztein WH, Kordon C: Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 1980;31:200-204.
- 22 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 23 Simpson AA, Simpson MHW, Shina YN, Schmidt GH: Changes in concentration of prolactin and adrenal corticosteroids in rat plasma during pregnancy and

lactation. *J Endocrinol* 1973;58:675-676.

- 24 Aizawa T, Greer MA: Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 1981;109:1731-1738.
- 25 Méndez M, Cruz C, Joseph-Bravo P, Wilk S, Charli JL: Evaluation of the role of prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 1990;17:55-62.
- 26 Van Tol HMV, Bolwerk ELM, Liu B, Burbach JPH: Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology* 1988;122:945-950.
- 27 Higuchi T, Tadokoro Y, Hondo K, Negoro H: Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 1986;110:251-257.
- 28 Grattan DR, Averill RLW: Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology* 1990;126:1199-1205.
- 42 29 Verdi JM and Campagnoni AT: Translational regulation by steroids. *J Biol Chem* 1990;265:20314-20320.
- 30 Mains RE, Dickerson IM, May V, Stoffers DA, Perkins AN, Ouafik L, Husten EJ, and Eipper BA: Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. *Front in Neuroendoc* 1990;11:52-89.
- 31 Joseph-Bravo P, Charli JL, Covarrubias L: Metabolism of thyrotropin releasing hormone; in Velasco M, Israel A, Silva H (eds): *Recent advances in pharmacology and therapeutics*. New York, elsevier, 1989, pp 215-219.

- 32 Lee SL: Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 1988;263:16604-16609.
- 33 Fukuda H, Ohshima K, Mori M, Kobayashi I, Greer MA: Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat. *Endocrinology* 1980;107:1711-1716.

Neuroendocrinology

Dear Colleague,

Your manuscript has been accepted for publication in Neuroendocrinology and will be published in an early issue of the journal.

Authors: RM Uribe, P Joseph-Bravo, J Pasten, G Ponce,
M Mendez, L Covarrubias, J-L Charli

Title: Some events of TRH metabolism...

Manuscript No. 90-265 (REVISED)

2-28-91

Date

Sincerely,

S. M. [Signature]

Editor-in-Chief

Neuroendocrinology

ANEXO 2

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 postranslational 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; 8 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

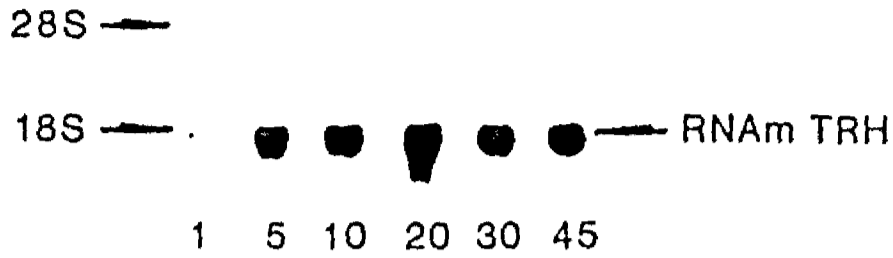
To determine whether TRH mRNA changes concomitantly with TRH levels within the hypothalamus, we measured both parameters during ontogeny (Fig. 1). TRH mRNA levels showed same increasing tendency as TRH within the first 20 days postnatal but, later in development, some differences were seen between TRH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

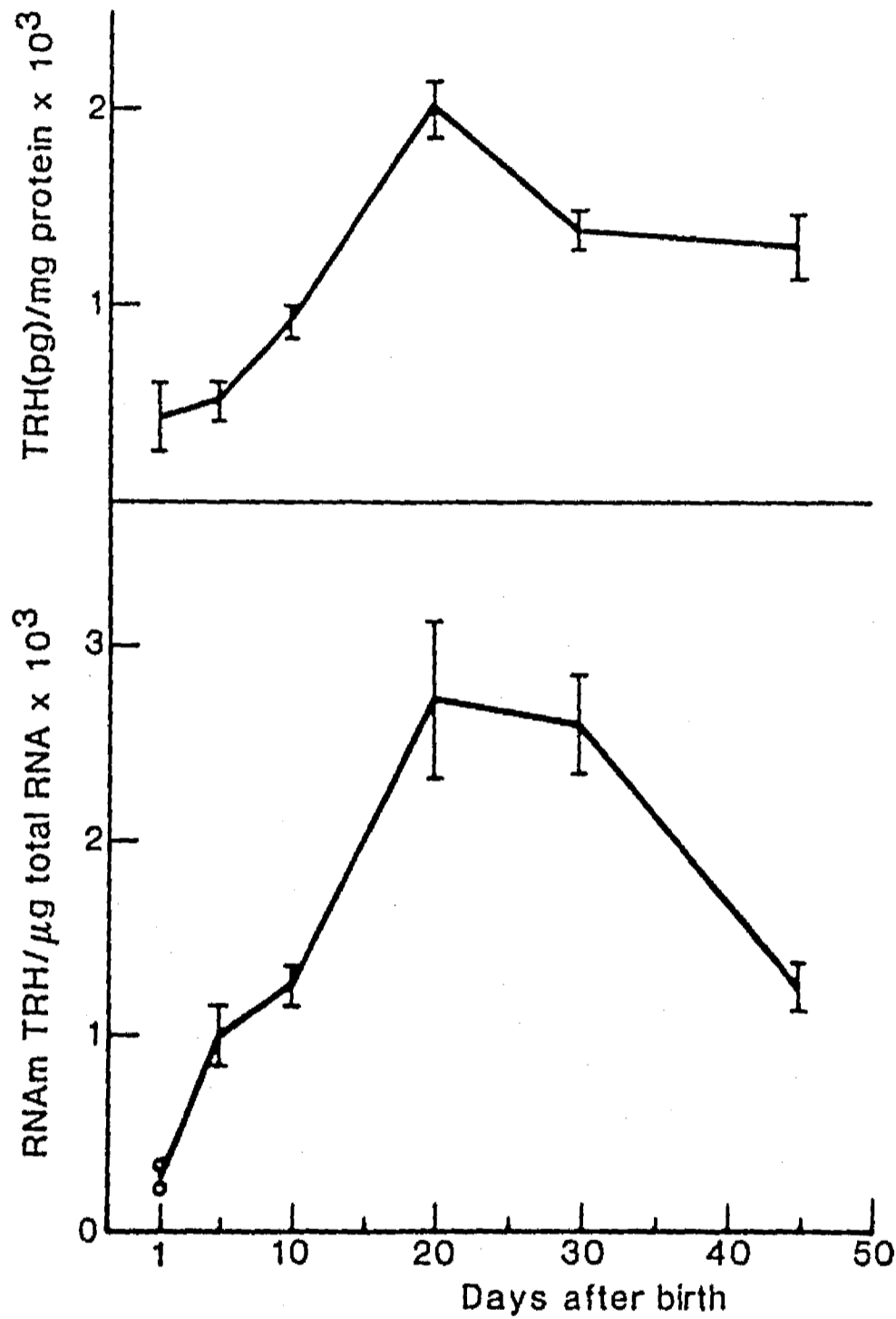


Fig. 1. TRH and TRH mRNA during ontogeny. Hypothalamic TRH and TRH mRNA were measured at different days after birth as indicated in Materials and Methods. (A) Autoradiography of representative RNA samples hybridized with TRH cDNA [³²P]-labeled; note that expected size (1.6 Kb) is seen at all ages. (B) 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

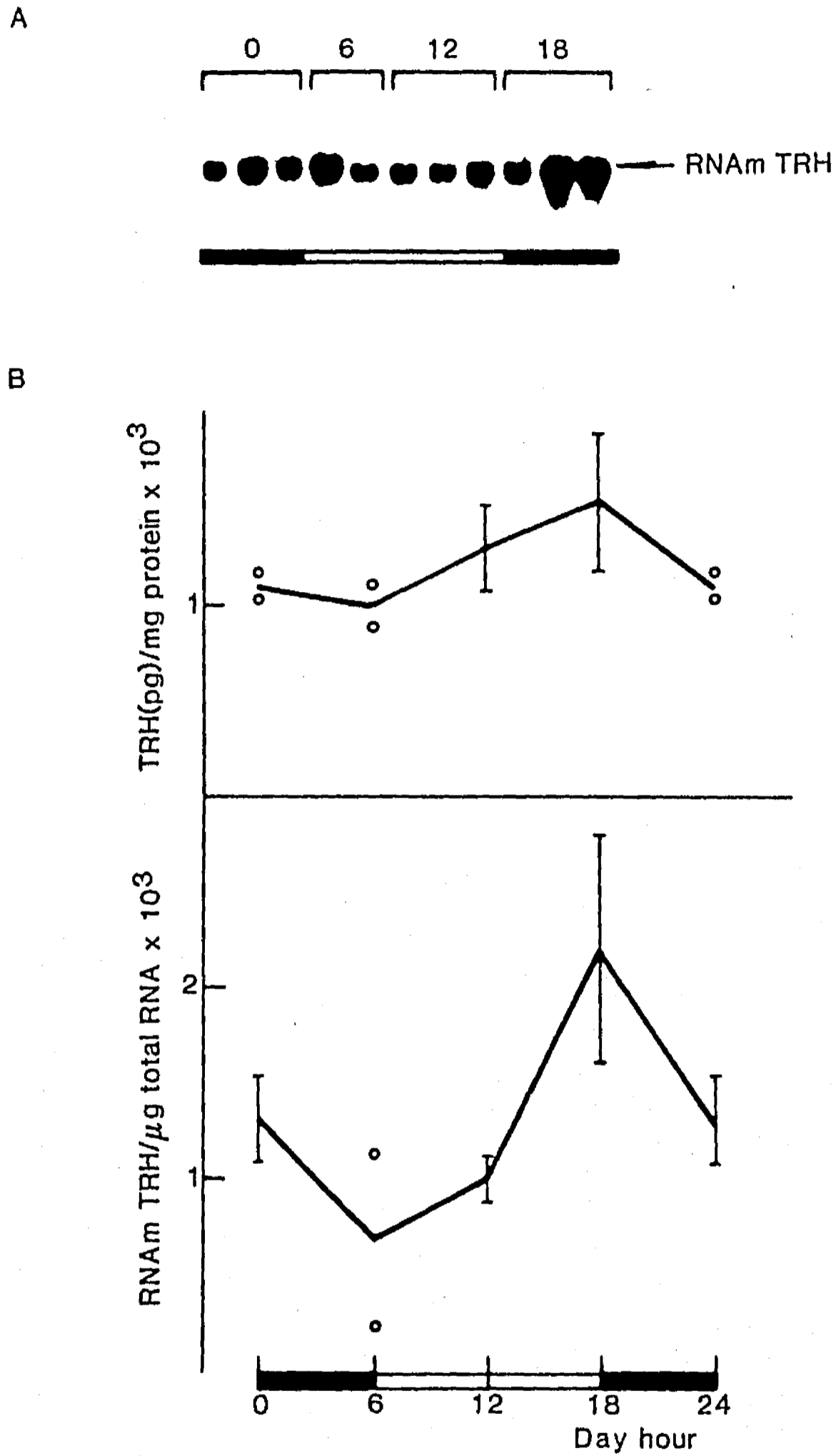


Fig. 2. TRH and TRH mRNA during circadian cycle. Hypothalamic TRH and TRH mRNA of adult rats were measured at different time of the day as indicated in Materials and Methods. (A) Autoradiography of RNA samples hybridized with TRH cDNA [32 P] labeled. (B) TRH and TRH mRNA were normalized per mg of protein and μ g of total RNA respectively. Mean \pm 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 postranslational 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 bare 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 postranslational 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

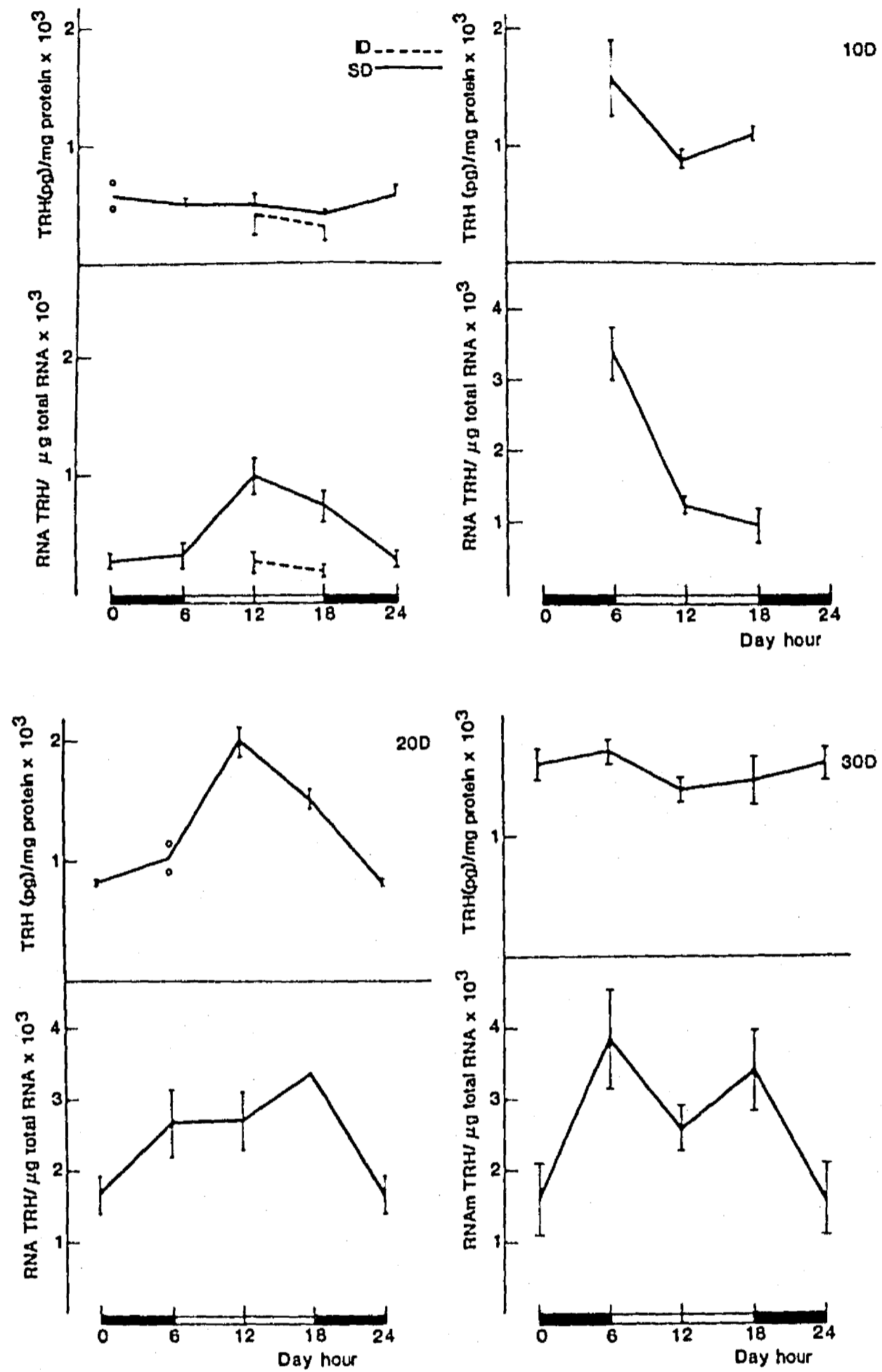


Fig. 3. Development of circadian TRH and TRH mRNA variations. Circadian TRH and TRH mRNA variations were measured at different days after birth. Observe that in most cases TRH and TRH mRNA peaks occur at the same time. Mean \pm SEM (n=3).

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 endogenous 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 ICSAXNA 030915 and PCEXCNA-051014.

REFERENCES

- 1.- Roberts, J.L., Eberwine, J.H. and Gee, C.E. (1985) Symposia 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., Eambini, 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., Mobtaker, 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., Karteszi, 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.- Glembotski, C.C., Manaker, S., Winokur, A. and Gibson, T.R. (1986) *J. Neurosc.* 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.

REFERENCIAS

- 1 B. Alberts, D. Bray, J. Lewis M. Raff, K Roberts, J. D. Watson, Eds., Cell signaling; In: Molecular Biology of the Cell Garland Publishing, Inc., New York & London. 1989 pags. 628-724.
- 2 J. Darnell J., H. Lodish, D. Baltimore, Eds., Cell-to-cell signaling: hormones and receptors. In: Molecular Cell Biology Scientific American Books, New York. 1990 pag. 709-762.
- 3 Evan R., 1988, The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science; 240:889-895.
- 4 Schally A.V., Coy D.H., and Meyers C.A., 1978, Ann. Rev. Biochem.; 47:89-128.
- 5 Seeburg P.H. and Adelman J.P., 1984, Characterization of cDNA for precursor of human luteinizing-hormone releasing hormone. Nature; 311:666-668.
- 6 Eipper B. A and R. E. Mains, 1980, Structure and biosynthesis of proadrenocorticotropin/endorphin and related peptides. Endocr. Rev. 1:1-11.
- 7 Lechan R. M., Wu P., Jackson I. M. D., Wolf H., Cooperman S., Mandel G. and Goodman R., 1986, Thyrotropin-releasing hormone precursor characterization in rat brain. Science; 231:159-161.
- 8 Gierasch L. M., 1989, signal Sequences. Biochemistry; 28: 923-930.
- 9 Rapoport T. A., 1990, Protein transport across the ER membrane. TIBS; 15:355-358.
- 10 B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, Eds., Intracellular sorting and the maintenance of celular compartments; In: Molecular Biology of the Cell Garland Publishing, Inc., New York & London. 1989 pags. 405-475.

- 11 Fisher J. M., Sossin W., Newcomb R., and Scheller R. H., 1988, Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell*; 54:813-822.
- 12 Mains R. E., Dickerson I. M., May V., Stoffers D. A., Perkins S. N., Ouafik L.H., Husten E. J., Eipper B. A., 1990, Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. *Frontiers in Neuroendoc.*; 11:52-89.
- 13 Fischer W. H. and Spiess J., 1987, Identification of a mammalian glutamyl cyclase converting glutamyl into pyroglutamyl peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*; 84:3628-3632.
- 14 Eipper B. A., Myers A. C., Mains R. E., 1985, Peptidylglycine α amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology*; 116:2497-12305.
- 15 Knight D. E., Grafenstein H. V., Athayde C. M., 1989, Calcium-dependent and calcium-independent exocytosis. *TINS*; 12:451-458.
- 16 Kelly R. B. 1988, The cell biology of the nerve terminal. *Neuron*; 1:431-438.
- 17 Charli J. L., Ponce G., McKelvy J. F. and Joseph-Bravo P. 1984, Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J. Neurochem.*; 42:981-986.
- 18 McKelvy J. F., Enzymatic degradation of brain peptides. In: *Brain peptides*, (Eds. Krieger D. T., Brownstein M. J. and Martin J. B., John Wiley & Sons, New York, 1983 pag. 117-133.
- 19 Mendez M., Cruz C., Josphe-Bravo P., Wilk S., and Charli J. L., 1990, Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides*; 17:55-62.
- 20 Charli J. L., Mendez M., Vargas M. A., Cisneros M., Assai M., Joseph-Bravo P. and Wilk S. 1989, Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH release from rat brain slices. *Neuropeptides*; 14:191-196.
- 21 Mitchell P. J., Tjian R., 1989, Transcriptional regulation in mammalian cells by

- sequence-specific DNA binding proteins. *Science*; 245: 371-378.
- 22 Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. A. 1987, Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. *Science*; 236:1237-1244.
 - 23 Sassone-Corsi P. and Borrelli E., 1986, Transcriptional regulation by trans-acting factors. *TIG*; 215-219.
 - 24 Kumar V. and Chambon P., 1988, The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*; 55: 145-156.
 - 25 Goodman R. H., 1990, Regulation of neuropeptide gene expression. *Annu. Rev. Neurosci.*; 13:111-127.
 - 26 Shupnik M. A., Gordon M. S. and Chin W. W., 1989, Tissue-specific regulation of rat estrogen receptor mRNAs. *Mol. Endoc.*; 3:660-665.
 - 27 Greenberg M. E., Ziff E. B. and Greene L. A., 1986, Stimulation of neuronal acetylcholine receptors induces rapid gene transcription. *Science*; 234:80-83.
 - 28 Kerr L. D., Jeffrey T. H. and Matrisian L. M., 1988, Growth factors regulate transient gene expression by c-fos-dependent and c-fos-independent pathways. *Science*; 242:1424-1427.
 - 29 Yamamoto K. K., Gonzalez G. A., Biggs W. H. and Montminy M. R., 1988, Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*; 334:494-498.
 - 30 Howard K. J., Holley S. J., Yamamoto K. R. and Distelhorst C. W., 1990, Mapping the hsp90 binding region of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.*; 265:11928-11935.
 - 31 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.

- 32 Wilcox J. N. and Roberts J. L., 1985, Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology*; 117:2392-2396.
- 33 La Gamma E. F. and Black I. B., 1989, Transcriptional control of adrenal catecholamine and opiate peptide transmitter genes. *Mol. Brain Res.*; 5:17-22.
- 34 Fremeau R. T., Lundblad J. R. Jr., Pritchett D. B., Wilcox J. N., Roberts J. L., 1986, Regulation of proopiomelanocortin gene transcription in individual cell nuclei. *Science*; 234:1235-1269.
- 35 Davidson N. O., Powell L. M., Wallis S. C. and Scott J., 1988, Thyroid hormone modulates the introduction of a stop codon in the rat liver apolipoprotein B messenger RNA. *J. Biol. Chem.*; 263:13482-13485.
- 36 Wall R. and Kuehl M., 1983, Biosynthesis and regulation of immunoglobulins. *Ann. Rev. Immunol.*; 1:393-422.
- 37 Yost H. S., Petersen R. B., and Lindquist S., 1990, RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *TIG*; 6: 223-227.
- 38 Romano G. J., Mobbs C. V., Howells R. D. and Pfaff D. W., 1989, Estrogen regulation of proenkephalin gene expression in the ventromedial hypothalamus of the rat: temporal qualities and synergism with progesterone. *Mol. Brain Res.*; 5:51-58.
- 39 Klausner R. D. and Harford J. B., 1989, Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science*; 246:870-872.
- 40 Yen T. J., Machlin P. S. and Cleveland D.W., 1988, Autoregulated instability of β -tubulin mRNAs by recognition of the nascent amino terminus of β -tubulin. *Nature*; 334:580-585.
- 41 Jackson R. J. and Standart N., 1990, Do the poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation?. *Cell*; 62:15-24.
- 42 Verdi J. M., and Campagnoni A. T., 1990, Translational regulation by steroids. *J. Biol. Chem.*; 265:20314-20320.

- 43 Thiele E. A., Marek K. L. and Eipper B. A., 1989, Tissue-specific regulation of peptidyl-glycine- α amidating monooxygenase expression. *Endocrinology*; 125:2279-2288.
- 44 Kemenade B. M. L. V., Jenks B. G. and Smits R. J. M., 1987, N-terminal acetylation of melanophore-stimulating hormone in the pars intermedia of *Xenopus laevis* is a physiologically regulated process. *Neuroendocrinology*; 46:289-296.
- 45 Menezes-Ferreira M. M., Petrick P. A. and Weintraub B. D., 1986, Regulation of thyrotropin (TSH) bioactivity by TSH-releasing hormone and thyroid hormone. *Endocrinology*; 118:2125-2130.
- 46 Schally A.V., Redding T., Bowers C. Y., and Barrett J. F., 1969, Isolation and properties of TRH. *J. Biol Chem.* 244:4077.
- 47 Burgus R., Dunn T. F., Desiderio D., Ward D. N., Vale W., Guillemin R., 1970, Characterization of ovine hypothalamic hypophysiotropic TSH-releasing factor. *Nature*; 226:321-325.
- 48 Lechan R. M., Wu P. and Jackson I. M. D., 1986, Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology*; 119:1210-1216.
- 49 Segerson T. P., Hoefler H., Childres H., Wolfe H. J., Wu P., Jackson I. M. D. and Lechan R. M. 1987, Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology*; 121:98-107.
- 50 Jackson I. M. D., Lechan R. M., Thyrotropin releasing hormone (TRH). In: *Brain peptides* (Krieger D., Brownstein M., Martin J. B., Eds.) John Wiley & Sons ed., New York, 1983 pag. 661-685.
- 51 Dutour A., Giraud P., Kowalski C., Ouafik L'H., Salers P., Strbak V., Oliver C., 1987, Ontogenesis of TRH mRNA in the rat pancreas. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*;

146:354-360.

- 52 Gkonos P. J., Tavianini M. A., Liu C. C., Roos B. A., 1989, Thyrotropin releasing hormone gene expression in normal thyroid parafollicular cells. *Mol. Endoc.*; 3:2101-2109
- 53 Taylor T., Weintraub B. D., 1985, Thyrotropin (TSH) releasing hormone regulation of TSH subunit biosynthesis and glycosylation in normal and hypothyroid rat pituitaries. *Endocrinology*; 116:1968-1976.
- 54 Arancibia S., Tapia-Arancibia L., Assenmacher I. and Astier H., 1983, Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology*; 37:225-228.
- 55 Hefco E., Krulich L., Illner P. and Larsen P. R., 1975, Effect of acute exposure to cold on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology*; 97:1185-1195.
- 56 Leong D. A., Frawley L. S. and Neill J. D. 1983, Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann. Rev. Physiol.*; 45:109-127
- 57 Potter E., Nicolaisen A. K., Ong E. S., Evans R. M. and Rosenfeld M. G. 1981, Thyrotropin-releasing hormone exerts rapid nuclear effects to increase production of the primary prolactin mRNA transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 78:6662-6666.
- 58 Fink G., Koch Y., and Aroya N. B., 1982, Release of thyrotropin releasing hormone into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Research*, 243:186-189.
- 59 De Greef W. J. and Visser T. J., 1981, Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J. Endocr.*; 91:213-223.
- 60 De Greef W. J., Voogt J. L., Visser T. J., Lamberts S. W. J. and Van Der Schoot. 1987, Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology*; 121:316-322.

- 61 Horn A. M., Fraser H. M. and Fink G. 1985, Effects of antiserum to thyrotropin-releasing hormone on the concentrations of plasma prolactin, thyrotropin and LH in the pro-oestrus rat. *J. Endocr.*; 104:205-209.
- 62 Grosvenor C. E. and Mena F. 1980, Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology*; 107:863-868.
- 63 Fagin K. D. and Neill J. D., 1981, The effect of dopamine on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinology*; 109:1835-1840.
- 64 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. Colluet et. al. eds.). Raven Press, New York, 1979, pag. 141-143.
- 65 Kerwin R. W. and Pycock C. J., 1979, Thyrotropin-releasing hormone stimulates release of H^3 -dopamine from slices of rat nucleus accumbens in vitro. *Br. J. Pharmacol*; 67:323-325.
- 66 Hori T., Yamasaki M., Asami T., Koga H. and Kiyohara T., 1988, Responses of anterior hypothalamic-preoptic thermosensitive neurons to thyrotropin releasing hormone and cyclo (his-pro). *Neuropharmacology*; 27:895-901.
- 67 Andrews J. S. and Sahgal A., 1983, The effects of thyrotropin-releasing hormone metabolites and analogues on locomotion activity in rats. *Regulatory peptides*; 7:97-109.
- 68 Taylor R. L. and Burt D., 1982, Species differences in the brain regional distribution of receptor binding for Thyrotropin releasing hormone. *J. Neurochem.*, 38;1649-1655.
- 69 Gordelase J. O., Rui H., Attramadal A. Tveter K., Gautvik K. M., Puvis K., 1988, Distribution of thyroliberin (TRH) and 10-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)-activated adenylyl cyclase in normal and neoplastic tissue with special reference to

- the prostate. *Mol. Cell. Endocrinol.*; 58:287-291.
- 70 Richter K., Kawashima E., Egger R. and Kreil G., 1984, Biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone in the skin of *Xenopus laevis* partial sequence of the precursor deduced from cloned cDNA. *EMBO J.*; 3:617-621.
- 71 Kuchler K., Richter K., Trnovsky J., Egger R. and Kreil G., 1990, Two precursors of thyrotropin-releasing hormone from skin of *Xenopus laevis*. *J. Biol. Chem.*; 265:11731-11733.
- 72 Zoeller R. T. and Conway K. M., 1989, Neurons expressing thyrotropin-releasing hormone-like messenger ribonucleic acid are widely distributed in *Xenopus laevis* brain. *Gen. Comp. Endocrinol.*; 76:139-146.
- 73 Lee S. L., Stewart K. and Goodman R. H., 1988, Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone. *J. Biol. Chem.*; 262:16604-16609.
- 74 Lechan R. M., Wu P. and Jackson I. M. D., 1987, Immunocytochemical distribution in rat brain of putative peptides derived from thyrotropin-releasing hormone prohormone. *Endocrinology*; 121:1879-1891.
- 75 Leduque P., Bulant M., Dubois P. M., Nicolas P. and Vaudry H., 1989, Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) in the adult rat pancreas: identification and localization of pro-TRH-related peptides in β -cells of pancreatic islets. *Endocrinology*; 125:1492-1497.
- 76 Cockle S. M. 1990, TRH-extended peptides in the olfactory lobe are formed by incomplete cleavage at pairs of arginine residues in the TRH prohormone. *FEBS Letters*, 264:253-256.
- 77 Bulant M., Roussel J-P., Astier H., Nicolas P. and Vaudry H., 1990, Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide, prepro-TRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 87:4439-4443.

- 78 Joseph-Bravo P., Charli J. L., Palacios J. M. and Kordon C., 1979, Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology*; 104:801-806.
- 79 Robins R. and Reichlin S., In vitro systems for the study of secretion and synthesis of hypothalamic peptides. In: *Neuroendocrine Perspectives*. (E.E. Muller and R. M. Macleod, Eds.) Elsevier Biomedical press, Amsterdam, pag. 11-113.
- 80 Joseph-Bravo P., Charli J. L., Covarrubias L., Metabolism of thyrotropin releasing hormone. In: *Recent advances in pharmacology and therapeutics*. (Velasco M., Israel A., Silva H. Eds.) Elsevier, New York, 1989, pag. 215-219.
- 81 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.
- 82 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.
- 83 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.
- 84 Orłowski M., Wilk E., Pearce S. and Wilk S., 1979, Purification and properties of a prolyl endopeptidase from rabbit. *J. Neurochem.*; 33:461-469.
- 85 Rondeel J. M. M., De Greef W. J., Visser T. J. and Voogt J. L., 1988, Effect of suckling on the in vivo release of thyrotropin-releasing hormone, dopamine and adrenaline in the lactating rat. *Neuroendocrinology*; 48:93-96.
- 86 Carr F. E., Ridway E. C., and Chin W. W., 1985, Rapid simultaneous measurement of rat and thyrotropin (TSH) β subunit messenger ribonucleic acids (mRNA) by solution hybridization: regulation of TSH subunit mRNAs by thyroid hormones. *Endocrinology*; 117:1272-1278.

- 87 Segerson T. P., Kauer J., Wolfe H. C., Mobtaker H., Wu P., Jackson I. M. D. and Lechan R. M., 1987, Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*; 238:78-80.
- 88 Mori M. and 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.
- 89 Ching M. C. H., Utiger R. D., 1983, Hypothalamic portal blood immunoreactive TRH in the rat: lack of effect of hypothyroidism and thyroid hormone treatment. *J. Endocrinol. Invest.*; 8:347-354.
- 90 Ponce G., Charli J. L., Pasten J. A., Aceves C. and Joseph-Bravo P., 1988, Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology*; 48:211-213.
- 91 Bauer K. 1988, Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie*; 70:69-74.
- 92 Bradley D. J., Young III W. S. and Weinberger C., 1989, Differential expression of α and β thyroid hormone receptor genes in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 86:7250-7254.
- 93 Tavianini M. A., Gkonos P. J., Lampe T. H. and Roos B. A., 1989, Dexamethasone stimulates thyrotropin-releasing hormone production in a C cell line. *Mol. Endocr.*; 3:605-610.
- 94 Gayo L., Bonet B., Herranz A. S., Iglesias R., Toro M. J. and Montoya E., 1986, Postnatal development of brain TRH, serum TSH and thyroid hormones in the male and female rat. *Acta Endocrinologica*; 112:7-11.
- 95 Taylor T., Gyves P. and Burgunder J. M., 1990, Thyroid hormone regulation of TRH mRNA levels in rat paraventricular nucleus of the hypothalamus changes during

- ontogeny. *Neuroendocrinology*, 52:262-267.
- 96 Herrera J., 1990, Ontogenia de la actividad de la piroglutamato aminopeptidasa II en varias zonas del cerebro y pancreas de la rata. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología Iztacala, UNAM.
- 97 Covarrubias M. L., Covarrubias L., Redondo J. L., Charli J. L. y Joseph-Bravo P., 1990, Efecto del AMPc sobre la biosíntesis y liberación de TRH en cultivos primarios de hipotálamo de cerebro de rata. XVIII Congreso de la Sociedad Mexicana de Bioquímica.
- 98 Schalling M., Arborelius L., Hokfelt T. and Post C., 1988, Decrease in gene expression of substance P and thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat medulla oblongata following treatment with an antidepressive drug. *Acta Physiol. Scand.*; 134:455-456.
- 99 Enjalbert A., Arancibia S., Ruberg M., Priam M., Bluet-Pajot M. T., Rotsztejn W. H. and Kordon C., 1980, Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology*; 31:200-204.
- 100 Valverde-R C. and Aceves C., 1989, Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. *Endocrinology*; 124:1340-1344.
- 101 Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., 1951, Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*; 193:265-275.
- 102 Simpson A. A., Simpson M. H. W., Shina Y. N. and Schmidt G. H., 1973, Changes in concentration of prolactin and adrenal corticosteroids in rat plasma during pregnancy and lactation. *J. Endocrinol.*; 58:675-676.
- 103 Stern J. M. and Voogt J. L. 1973/74, Comparison of plasma corticosterone and prolactin levels in cycling and lactating rats. *Neuroendocrinology*; 13:173-181.
- 104 Park O-O, Gugneja S. and Mayo K. E., 1990, Ganadotropin-releasing hormone gene expression during the rat estrous cycle: effects of pentobarbital and ovarian steroids.

Endocrinology; 127:365-371.

- 105 Lee W-S., Smith M. S. and Hoffman G.E. 1990, Luteinizing hormone-releasing hormone neurons express fos protein during the proestrous surge of luteinizing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:5163-5167
- 106 Cato A. C. B., Miksicek R., Schütz G., Arnemann J., and Beato M., 1986, The hormone regulatory element of mouse mammary tumour virus mediates progesterone induction. *EMBO J.*; 5:2237-2240.
- 107 Vargas M. A., Ponce G., Redondo J. L., Kordon., Charli J. L. and Joseph-Bravo P. "TRH down regulates pyroglutamata aminopeptidase II activity in adenohipophysis". *Peptidase and Neuropeptidases Processing*. In: International Society for Neurochemistry, 13th Biennial Meeting Sidney, Australia. 15-19 July 1991.
- 108 De Greef W. J., Plotsky P. M. and Neill J. D., 1981, Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology*; 32:229-233.
- 109 Grattan D. R. and Averill R. L. W., 1990, Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology*; 126:1199-1205.
- 110 Van Tol H. H. M., Bolwerk E. L. M., Liu B. and Burbach J. P. H., 1988, Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology*; 122:945-951.
- 111 Soloff M. S., Alexandrova M. and Fernstrom M. J., 1979, Oxytocin receptors: triggers for parturition and lactation?. *Science*, 204:1313-1315.
- 112 Don Carlos L. L., Greene G. L. and Morell J. I., 1989, Estrogen plus progesterone increases progestin receptor immunoreactivity in the brain of ovariectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology*; 50:613-623.
- 113 Sousa R. J., Tannery N. H. and Lafer E. M., 1989, In situ hybridization mapping of

glucocorticoid receptor messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol. Endocr.*; 3:481-488

- 114 Barofsky A-L., Taylor J. and Massari V. J., 1983, Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology*; 113:1894-1903.
- 115 Moneta M. E. and Holtt V., 1990, Perforant path kindling induces differential alterations in the mRNA levels coding for prodynorphin and proenkephalin in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.*; 110:273-278.
- 116 LaGamma E. F., White J. D., Adler J. E., Krause J. E., McKelvy J. F. and Black I. B., 1985, Depolarization regulates adrenal preproenkephalin mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 82:8252-8255.
- 117 Lightman S. L. and Young III W. S., 1988, Corticotropin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J. Physiol.*; 403:511-523.
- 118 Lightman S. L. and Young III W. S., 1989, Influence of steroids on the hypothalamic corticotropin-releasing factor and preproenkephalin mRNA responses to stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 86:4306-4310.
- 119 Fort P., Rech J., Vie A., Piechaczyk M., Bonnieu A., Jeanteur P. and Blanchard J-M., 1987, Regulation of c-fos gene expression in hamster fibroblast: initiation and elongation of transcription and mRNA degradation. *Nucl. Acids Res.*; 15:5657-5667.
- 120 Clements J. A. and Fuller P. J., 1990, Tissue kallikrein in pituitary and brain. *Frontiers in Neuroendocr.*; 11:38-51.
- 121 Arancibia S., Tapia-Arancibia L., Astier H. and Assenmacher I. 1989, Physiological evidence for α -adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci. Letters*; 100:169-174.

- 122 Chang F-H. and Bourne H. R., 1987, Dexamethasone increases adenylyl cyclase activity and expression of the α -subunit of G_s in GH₃ cells. *Endocrinology*; 121:1711-1715.
- 123 Schumacher M. 1990, Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends in Neurosci.*, 13:359-362.