

00551

15



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
DIRECCIÓN GENERAL DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

297342

Expresión del mRNA que codifica al receptor de neurotrofinas TrkB<sup>TK+</sup>  
en el núcleo paraventricular del hipotálamo de rata durante el desarrollo,  
y su relación con la expresión del mRNA de la hormona  
liberadora de tirotrópina

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
PRESENTA  
JOSÉ ANTONIO GONZÁLEZ SÁNCHEZ

OJERNAVACA, MORELOS

DE LA BIBLIOTECA  
ESTA TESIS ES DE

2001



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Trabajo realizado en el laboratorio de Neurobiología Molecular  
y Celular bajo la dirección del Dr Jean-Louis Charli, con apoyo  
parcial de la Dirección General de Asuntos del Personal  
Académico, UNAM (IN 223599)

## **Director de Tesis**

---

Dr Jean-Louis Charli

## **Comité Tutorial**

---

Dra Hilda Lomeli  
Dr Luis Covarrubias  
Dr Jean-Louis Charli

## **Jurado de Examen**

---

Presidente	Dr Luis Covarrubias
Secretario	Dr Jean-Louis Charli
Vocal	Dr Miguel Angel Morales
Suplente	Dr Enrique Reynaud
Suplente	Dr Enrique Salas

# Índice

---

Índice.....	4
Abreviaturas.....	5
Resumen.....	7
Introducción.....	8
Las neurotrofinas y sus receptores .....	8
Estructura de las neurotrofinas y de sus receptores .....	9
Vías de señalización utilizadas por los receptores Trk y p75NTR.....	12
Participación de BDNF en la diferenciación del fenotipo peptidérgico .....	13
Expresión de las neurotrofinas y sus receptores en el núcleo paraventricular del hipotálamo.....	14
Desarrollo del núcleo paraventricular hipotalámico y diferenciación de las neuronas TRHérgicas.....	16
Justificación.....	20
Objetivo.....	20
Estrategia Experimental.....	21
Materiales y Métodos .....	22
Animales .....	22
Sondas .....	22
Hibridación <i>in situ</i> .....	23
Resultados.....	26
Hibridación <i>in situ</i> fluorescente.....	26
Especificidad de los oligodeoxinucleótidos .....	26
Expresión del mRNA de TRH en el hipotálamo medio.....	27
El mRNA de TrkB <sup>TK+</sup> se expresa abundantemente a lo largo del hipotálamo.....	31
Discusión.....	32
Anexos.....	38
1. Gelatinización de laminillas.....	38
2. Secuencias de los oligonucleótidos usados .....	39
3. Reactivos .....	40
4. Soluciones .....	41
5. Marcaje de oligodeoxinucleótidos con terminal deoxinucleotidil transferasa y <sup>35</sup> SdATP .....	45
6. Cálculo de la actividad específica de los oligonucleótidos.....	46
Referencias .....	47

## Abreviaturas

---

aa	aminoácido(s)
Akt	proteína cinasa serina-treonina
aPV	núcleo anterior periventricular del hipotálamo
Arnt2	factor transcripcional de la familia bHLH-PAS
aVP	arginina-vasopresina
BDNF	factor neurotrófico derivado de cerebro
bHLH	hélice-vuelta-hélice básico
Bm2	factor transcripcional de la familia POU
BrdU	bromodeoxiuridina
CRH	hormona liberadora de corticotropina
d	dominio
DRG	ganglio de la raíz dorsal
E	día de desarrollo embrionario
FAP1	fosfatasa 1 asociada a Fas
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
Grb2	proteína adaptadora de unión a receptor de factor de crecimiento
ISH	hibridación <i>in situ</i>
JNK	cinasa amino-terminal de Jun
LH	hipotálamo lateral
MEK	cinasa de MAPK
MAPK	proteína cinasa activada por mitógenos
mRNA	ácido ribonucléico mensajero
NGF	factor de crecimiento nervioso
NPY	neuropéptido Y
NRIF	factor de interacción con el receptor a neurotrofinas
NT	neurotrofina
OT	oxitocina
Otp	orthopedia; factor transcripcional de la familia de homeoproteínas
Otx2	factor transcripcional de la familia de homeoproteínas relacionado a orthodenticle
P	día de desarrollo postnatal
p75NTR	receptor de neurotrofinas p75
PAS	dominio protéico identificado inicialmente en las proteínas Period, Arnt y Single-minded
Pax	familia de factores transcripcionales producto de genes 'pair-rule'
PDB	Protein Data Bank
PI3K	fosfatidil inositol 3-cinasa

PLC- $\gamma$	fosfolipasa C- $\gamma$
POU	dominio común identificado inicialmente en las proteínas Pit, Oct y Unc
PVN	núcleo paraventricular del hipotálamo
rAPS	molécula de rata adaptadora que contiene dominios PH y SH2
RNDM	oligodeoxinucleótido 'random'
SC-1	factor 1 de células de Schwann
SH	dominio de homología a Src
Shc	colágena y homología Src
Sim1	Single-minded; factor transcripcional de la familia bHLH-PAS
SON	núcleo supraóptico del hipotálamo
SRIH	somatostatina
TK	tirosina cinasa
TRAF	factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRH	hormona liberadora de tirotrópina
Trk	receptor de la familia tirosina cinasa

## Resumen

---

Las neurotrofinas son un grupo de polipéptidos de la familia del factor de crecimiento nervioso (NGF) que participan en el desarrollo y mantenimiento del sistema nervioso. En los mamíferos se han descrito cuatro miembros de esta familia: NGF, factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina (NT) 3 y NT4. Las acciones de estos péptidos son mediadas principalmente por su unión a receptores de la familia tirosina cinasa (Trk). Así, NGF es el ligando de TrkA; BDNF y NT4 son ligandos de TrkB; y NT3 preferentemente se une a TrkC, aunque también puede ser ligando de TrkA y TrkB. Los receptores TrkB y TrkC presentan isoformas catalíticas y variantes no catalíticas.

La acción de las neurotrofinas en distintos grupos neuronales puede favorecer la expresión de ciertos neuropéptidos. En el caso de BDNF, se sabe que incrementa y mantiene la expresión de neuropéptido Y (NPY) y de somatostatina (SRIH) en cultivos de neuronas corticales, y de SRIH en cultivos de hipotálamo fetal de rata. También en cultivos fetales de rata se ha observado que BDNF incrementa tanto el contenido de mRNA de SRIH como la liberación de este péptido al medio en las neuronas productoras de SRIH del núcleo periventricular del hipotálamo. En experimentos *in vivo*, la administración intraventricular de BDNF incrementa los niveles de NPY, de SRIH y de sustancia P, así como el de los mensajeros respectivos en la neocorteza anterior. Además, BDNF induce NPY en el tálamo, hipocampo y estriado de ratas neonatas. En los ratones *bdnf*<sup>-/-</sup>, los niveles de NPY en corteza e hipocampo disminuyen drásticamente.

Por otro lado, se sabe que en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) de ratas adultas se expresan los mRNAs de TrkB y de BDNF, y se ha identificado a TrkB en esta misma región. Además, en nuestro laboratorio se demostró previamente que BDNF incrementa los niveles del mRNA de la hormona liberadora de tirotropina (TRH) en cultivos primarios embrionarios del hipotálamo, pero sólo en aquellas células TRHérgicas que expresan el mRNA del receptor TrkB.

Dado el posible efecto de BDNF, mediado por TrkB, en la adquisición de determinados fenotipos peptidérgicos, en este proyecto definimos el patrón espacio-temporal de expresión del mRNA de la isoforma catalítica de TrkB y del mRNA de TRH *in vivo* en el PVN de rata mediante técnicas de hibridación *in situ* durante el desarrollo prenatal, a partir del día 14 de gestación.

Los resultados indican que la expresión del mRNA que codifica la isoforma catalítica del receptor TrkB en el PVN de rata antecede cronológicamente a la expresión del mRNA de TRH. Además, ambos mensajeros coinciden espacialmente en esta región hipotalámica. Estos resultados apoyan la posibilidad de que la activación de este receptor durante el desarrollo sea uno de los elementos que participan en la determinación fenotípica de las neuronas TRHérgicas del PVN.



## Introducción

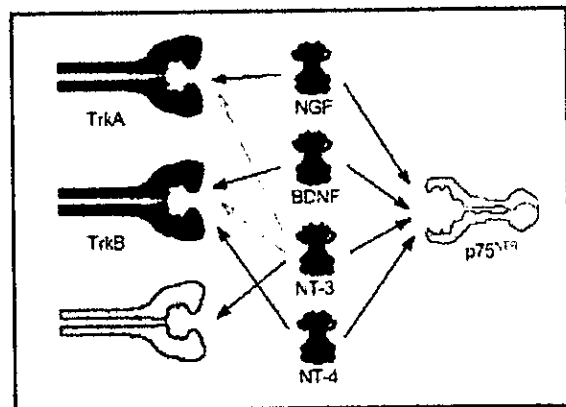
### Las neurotrofinas y sus receptores

Las neurotrofinas son una familia de factores tróficos conocidos por su participación en procesos de diferenciación, supervivencia y mantenimiento neuronal (revisado en Chao 1992, Lo 1995, Chao et al 1998, Skaper y Walsh 1998, Huang y Reichardt 2001). Además, se les ha implicado en procesos de naturaleza no trófica, actuando como moduladores (Schuman 1999) o como mediadores de la transmisión sináptica (ver p.ej. Kafitz et al 1999, Heppenstall y Lewin 2001).

El primer miembro de esta familia en ser descubierto fue el factor de crecimiento nervioso ('nerve growth factor', NGF), descrito por Rita Levi-Montalcini y Viktor Hamburger a finales de la década de 1950 como una sustancia esencial para la supervivencia y mantenimiento de células sensoriales espinales y neuronas simpáticas (una buena perspectiva histórica de este descubrimiento puede leerse en Cowan 2001). En mamíferos, se han encontrado a partir de entonces tres neurotrofinas más: el factor neurotrófico derivado de cerebro ('brain-derived neurotrophic factor', BDNF), la neurotrofina (NT) 3, y la NT4 (también conocida como NT4/5) (revisado por Fariñas y Reichardt 1996, Skaper y Walsh 1998, Huang y Reichardt 2001). Además, en peces se han caracterizado la NT6 (Götz et al 1994) y la NT7 (Lai et al 1998, Nilsson et al 1998), cuya función es poco clara, y ninguna de las dos parece tener ortólogos en mamíferos o aves.

Para llevar a cabo su función, las neurotrofinas se unen a cualquiera de dos clases diferentes de receptores de membrana (revisiones recientes en Frade y Barde 1998, Lee et al 2001, Patapoutian y Reichardt 2001), ya sea al receptor de baja afinidad p75<sup>NTR</sup>, miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral, el cual reconoce a todas las neurotrofinas con afinidad similar (nanomolar), o a alguno(s) de los tres que conforman la familia Trk de receptores tirosina cinasa: TrkA, TrkB y/o TrkC (Fig 1), que reconocen a las neurotrofinas con afinidad más alta (picomolar) que el p75<sup>NTR</sup>.

Los genes de los receptores Trk son parálogos, puesto que se originaron a partir de duplicaciones de un gen ancestral común; igualmente los genes que codifican a las neurotrofinas son parálogos, y se ha sugerido que tanto las neurotrofinas como sus receptores Trk han co-evolucionado (van Kesteren et al 1998,



**FIGURA 1.** Especificidad de los receptores a neurotrofinas por sus ligandos. p75<sup>NTR</sup> reconoce con similar afinidad a todos los miembros de la familia de las neurotrofinas. NGF es reconocido preferentemente por TrkA, BDNF y NT4 por TrkB, y NT3 por TrkC. NT3 puede activar también a TrkA y a TrkB, pero con menor eficiencia. (Fuente: Ibáñez 1998, pp440)

Hallböök 1999). Esto podría explicar el hecho de que las neurotrofinas interactúan de manera específica con alguno de los receptores Trk: TrkA une a NGF, NT6 y NT7; TrkB es el receptor de BDNF y NT4, y TrkC es el receptor de NT3 (sin embargo esta última neurotrofina es capaz de activar con menor eficiencia a TrkA o TrkB) (Barbacid 1995, Huang y Reichardt 2001).

### Estructura de las neurotrofinas y de sus receptores

Las neurotrofinas son homodímeros con una muy alta homología estructural entre ellas, cuyas secuencias comparten alrededor del 50% de identidad. Los monómeros son alargados (Fig 2), con una porción central formada por dos pares de tiras  $\beta$  antiparalelas responsables de la mayor parte de las interacciones que estabilizan al dímero. En uno de sus extremos, aquel que apunta lejos de la membrana plasmática cuando se une a su respectivo receptor Trk (Figs 2 y 3), cada monómero tiene un asa, los extremos C- y N-terminales, y un dominio tipo 'nudo de cisteínas', formado por tres puentes disulfuro, el cual estabiliza el plegamiento. En el extremo opuesto hay tres asas más y cuatro pequeñas tiras  $\beta$  formando dos hojas  $\beta$  antiparalelas. Los homodímeros se forman por la unión en sentido paralelo de los monómeros correspondientes (revisado en Ibáñez 1998, Wiesmann y de Vos 2001).

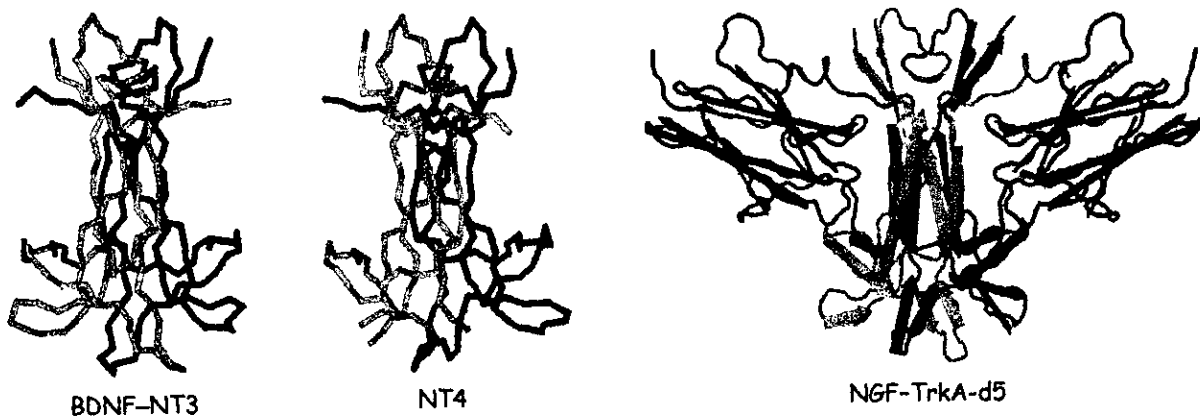


**FIGURA 2.** Estructura del monómero de NGF murino (número de acceso PDB 1BET). Al unirse a su receptor TrkA, la membrana quedaría ubicada hacia abajo, perpendicular al plano del esquema. Diagrama generado con el software Cn3D 3.0 (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA), con datos del Protein Data Bank (PDB) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>).

Por su parte, los receptores Trk son polipéptidos glicosilados conformados por una porción extracelular amino-terminal que es la que une a su respectivo ligando, una porción transmembranal, y una tercera porción intramembranal carboxi-terminal (Fig 4) (revisado en Barbacid 1995, Hubbard 1999).

La porción extracelular está conformada por dos dominios (d) ricos en cisteínas (d1 y d3) que flanquean una región rica en leucinas (d2), y por dos dominios tipo inmunoglobulina (Ig1 e Ig2 o d4 y d5, respectivamente) ubicados hacia la porción transmembranal. Estudios de mutagénesis dirigida han demostrado que en TrkA y TrkC (Urfer et al 1998) y en TrkB (Kojima et al 1999), el segundo dominio tipo Ig (Ig2) es el dominio encargado de unir a la neurotrofina correspondiente, y es además el que confiere la especificidad por el ligando. Mediante cristalografía ha sido posible definir las diferencias estructurales en este dominio Ig2 posiblemente involucradas en determinar la especificidad de cada receptor Trk por su ligando (Ultsch et al 1999, Wiesmann y de Vos 2001). Es interesante notar que la afinidad de los diferentes receptores Trk por sus ligandos puede ser modificada

por interacción directa con el receptor p75NTR: en transfecciones estables en una línea celular, la especificidad de activación de TrkB por BDNF incrementa notablemente (en comparación con NT3 y NT4) si se coexpresa con p75NTR (Bibel et al 1999).

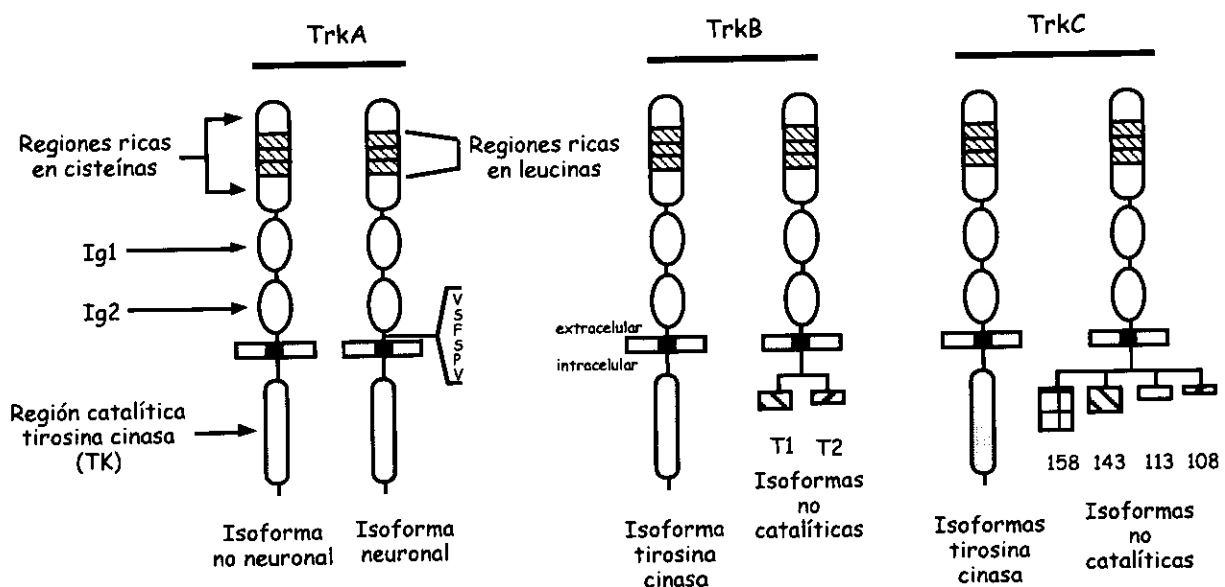


**FIGURA 3.** Modelos tridimensionales del heterodímero BDNF-NT3, y los homodímeros NT4 y NGF de humano. Los monómeros que conforman estas estructuras están en verde y en azul. NGF se muestra en complejo con el dominio 5 (rojo y morado) de TrkA, asumiendo que la membrana celular se encontrara hacia abajo. El heterodímero BDNF-NT3 es un modelo realizado *in vitro*, sin relevancia biológica conocida hasta el momento. Imágenes generadas con el software Cn3D 3.0 (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA), con datos del Protein Data Bank (PDB) (ver: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>) (números de acceso PDB: BDNF-NT3, 1BND; NT4, 1B98; complejo NGF-TrkA-d5, 1WWW).

La región más conservada entre los receptores Trk es la catalítica: en esta región la secuencia de aminoácidos (aa) del receptor TrkB murino posee una identidad del 75% con respecto al TrkA humano, mientras que, en la región extracelular, estos dos receptores solamente comparten una identidad del 37% (Middlemas et al 1991). Un porcentaje similar de identidad se encuentra entre las regiones intracelulares del receptor TrkC porcino y del TrkA de humano (revisado en Chao 1992). La característica estructural más notable en esta región citoplásmica es la presencia de 10 residuos de tirosina conservados entre miembros de la familia, de los cuales tres forman parte del circuito autoregulatorio del dominio cinasa, y el resto, al ser fosforilados, crean sitios de unión a proteínas adaptadoras que forman parte de cascadas de señalización intracelular (ver adelante) (Huang y Reichardt 2001). En el extremo C-terminal, de tan sólo 15 aa, se localiza la tirosina encargada de unir a la fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) (Barbacid 1995).

Aparte de la estructura general descrita, cada gen *Trk* es capaz de codificar variantes de su respectivo receptor (Fig 4) mediante 'splicing' alternativo (Middlemas et al 1991, Huang y Reichardt 2001). Así, *TrkA* codifica dos isoformas, una de 790 y otra de 796 aa, siendo esta última la que se expresa preferentemente en neuronas (Barbacid 1995), y *TrkB* y *TrkC* codifican variantes no catalíticas, designadas como Trk<sup>TK-</sup>, que poseen regiones extracelulares y transmembranales idénticas a su isoforma catalítica correspondiente, pero carecen del

domino catalítico tirosina cinasa (TK). Se han identificado dos variantes no catalíticas para TrkB: TrkB.T1, con 23 aa en su región intracelular, y TrkB.T2, cuyo dominio intracitoplásmico está formado por 21 aa (Klein et al 1990a, Middlemas et al 1991). Es probable que estas variantes participen en procesos regulatorios, como efectores negativos de TrkB<sup>TK+</sup> (Ohira et al 1999), e incluso se ha propuesto la posibilidad de que las isoformas no catalíticas activen cascadas de transducción aún no definidas, puesto que, en líneas celulares que expresan TrkB.T1 o TrkB.T2 BDNF incrementa la tasa de liberación de metabolitos ácidos, lo cual se relaciona con la activación de vías intracelulares de señalización (Baxter et al 1997). Por otro lado, el gen *TrkC* codifica cuatro variantes TrkC<sup>TK-</sup>, con funciones biológicas poco claras hasta el momento (Barbacid 1995).



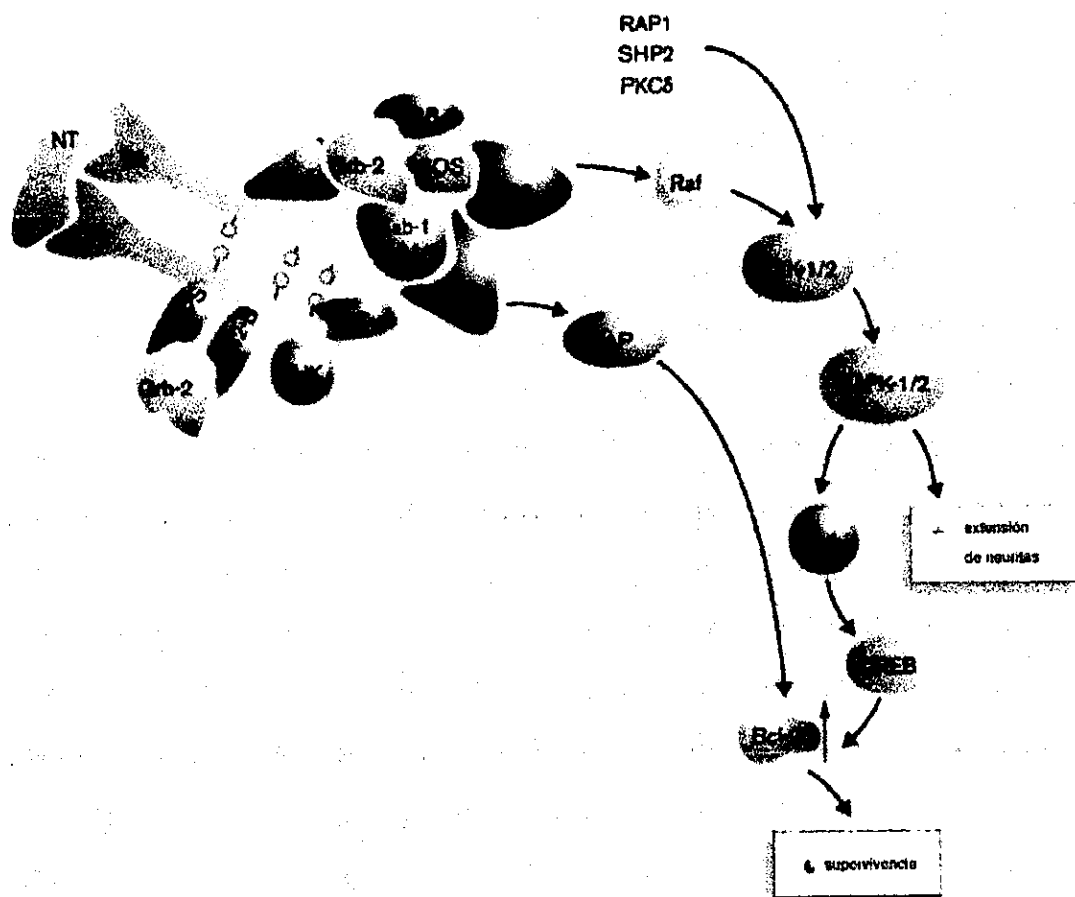
**FIGURA 4.** Modelos de la estructura de los receptores a neurotrofinas Trk. El gen *TrkA* codifica dos isoformas, de las cuales la neuronal posee seis residuos extra entre la región Ig2 y la transmembranal. Tres isoformas del receptor TrkB pueden encontrarse: una catalítica (TrkB<sup>NT+</sup>) y dos no catalíticas (TrkB.T1 y TrkB.T2). El gen *TrkC* codifica al menos ocho isoformas del receptor, de las cuales cuatro son catalíticas (varían en el número de aminoácidos presentes en la región TK) y cuatro no lo son. Los números bajo las formas no catalíticas del receptor TrkC indican el número de residuos presentes en la región citoplásmica de cada uno. (Fuente: adaptado de Barbacid 1995, pp445)

El receptor p75NTR es una glicoproteína transmembranal que carece de actividad catalítica (revisado en Meldolesi et al 2000). Presenta un dominio extracelular que consta de cuatro repeticiones ricas en cisteínas (Wiesmann y de Vos 2001), y un dominio intracelular de 145 aa, o 'dominio de muerte', que está formado por seis hélices, acomodadas en dos grupos perpendiculares de tres hélices cada uno, lo que le confiere una estructura globular (Liepinsh

et al 1997) capaz de unir a diferentes proteínas que participan en señalización mediante mecanismos diferentes de la actividad TK que presentan los receptores Trk (ver adelante).

### Vías de señalización utilizadas por los receptores Trk y p75NTR

Hasta el momento se conocen dos vías de señalización principalmente cuya activación es capaz de mediar los efectos de las neurotrofinas a través de los receptores Trk: la vía de fosfatidil inositol 3-cinasa (PI3K)—proteína cinasa serina-treonina Akt, y la vía de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) (Fig 5) (revisado recientemente en Kaplan y Miller 2000). Empleando diferentes mutantes de TrkB en cultivos primarios de neuronas simpáticas se ha demostrado que la supervivencia neuronal depende principalmente de la activación de la vía de PI3K, mientras que el crecimiento axonal depende de ambas vías (Atwal et al 2000).



**FIGURA 5.** Vías de señalización utilizadas por los receptores Trk. Se explica en el texto. (Fuente: Kaplan y Miller 2000, pp 382)

La unión de la neurotrofina a su receptor Trk induce la dimerización de éste y la autofosforilación de residuos de tirosina específicos en la región catalítica TK. La región TK fosforilada es identificada por PLC-γ1 o por la proteína adaptadora Shc. Esta última a su vez activa a la proteína Ras, que es una proteína de unión a GTP. Ras activa la vía MAPK y activa

también a PI3K (Fig 5) (Kaplan y Miller 2000). En líneas celulares de fibroblastos murinos se ha demostrado que éstos eventos iniciales ocurren de manera muy similar independientemente del receptor Trk activado (Yuen y Mobley 1999). Alternativamente, es posible inducir diferenciación en líneas celulares PC12 por mecanismos independientes de Shc ('Src homology and collagen') y de PLC- $\gamma$ 1, puesto que la región TK fosforilada puede ser reconocida también por las proteínas rAPS (molécula de rata adaptadora que contiene dominios PH y SH2) y SH ('Src homology') 2-B, las cuales unen a Grb2 (proteína adaptadora de unión a receptor de factor de crecimiento), que activa la vía de MAPK. Se sabe que éstas proteínas rAPS y SH2-B reconocen a TrkB y TrkC en neuronas corticales, y SH2-B a TrkA en neuronas simpáticas (Qian et al 1998). Por otro lado, ha sido demostrado que es posible activar al receptor TrkA (en células PC12) y al TrkB (en neuronas hipocampales) sin necesidad de neurotrofinas, mediante la activación del receptor de adenosina A<sub>2A</sub>, el cual es capaz de promover indirectamente la fosforilación de estos receptores Trk (Lee y Chao 2001).

El hecho de que p75NTR no posea actividad catalítica, que los receptores Trk sean más selectivos por su ligando, y que el fenotipo que resulta de deleciones en ratón de algún gen *Trk* correlacione de modo más claro con los fenotipos resultantes de las deleciones de las neurotrofinas, hace pensar que la mayoría de los efectos de las NTs están mediados por la activación de los receptores Trk y no por p75NTR (revisado en Dechant y Barde 1997). Además, las vías de transducción mediadas por p75NTR son menos conocidas. Se cree que la función fundamental del receptor p75NTR es inducir muerte celular (ver p.ej. Casaccia-Bonnel et al 1996, Frade et al 1996), dependiente de la activación de caspasas vía JNK (cinasa amino-terminal de Jun)-p53-Bax (Kaplan y Miller 2000). Sin embargo hay más alternativas: se han identificado recientemente diferentes factores capaces de interactuar directamente con el dominio intracelular de este receptor, que incluyen FAP-1 ('Fas-associated phosphatase 1'), un modulador negativo del proceso de apoptosis; las proteínas con dedos de zinc NRIF ('neurotrophin receptor interacting factor') y SC-1 (factor 1 de células de Schwann); y algunos miembros de la familia TRAF (factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral), que pueden promover la apoptosis así como inhibirla (Kaplan y Miller 2000, Meldolesi et al 2000, Lee et al 2001). Los efectos de activar p75NTR no siempre son predecibles puesto que generalmente dependen de la interacción con otros factores regulatorios. Por ejemplo, hay células que expresan p75NTR que en ausencia de neurotrofinas *in vitro* mueren, y que sobreviven en presencia de éstas (Meldolesi et al 2000). Sin embargo, NGF (o BDNF) es proapoptótico si tales células no expresan TrkA (o, en su caso, TrkB) (Dechant y Barde 1997, Kaplan y Miller 2000).

### **Participación de BDNF en la diferenciación del fenotipo peptidérgico**

Al conjunto de características anatómicas, fisiológicas y bioquímicas que adquieren las neuronas durante el desarrollo se le conoce como fenotipo (revisado en Harris y Hartenstein 1999), el cual suele definirse como 'neuropeptidérgico' en aquel conjunto de neuronas que se caracterice por la expresión de algún péptido que, actuando como neurotransmisor,

neuromodulador o neurohormona, sea capaz de influir en la función de otras neuronas (o en la de órganos o tejidos no neurales), aún cuando tales neuronas puedan coexpresar neurotransmisores clásicos (p.ej. acetilcolina o monoaminas) (revisado en Strand 1999). En la adquisición del fenotipo participan señales extrínsecas, tales como hormonas y factores de crecimiento, y señales intrínsecas, caracterizadas por patrones específicos de expresión de diversos genes (Harris y Hartenstein 1999). Como ejemplo de éstos últimos, se sabe que la participación de algunos factores de transcripción de las familias bHLH, POU y Pax es determinante en la definición de ciertos fenotipos neuropeptidérgicos (revisado en Anderson y Jan 1998) (ver adelante para una discusión sobre casos concretos).

Dentro del grupo de los factores tróficos existen ejemplos de cómo la acción de las neurotrofinas sobre ciertas subpoblaciones neuronales puede favorecer la adquisición de un fenotipo determinado (una discusión amplia y reciente sobre este tema puede leerse en Huang y Reichardt 2001). En cultivos primarios fetales de neocorteza de rata, la adición de BDNF eleva los niveles de neuropéptido Y (NPY) y de somatostatina (SRIH), lo que no ocurre si se adiciona NGF o NT3 (Nawa et al 1993). Igualmente, la administración intraventricular de BDNF a ratas neonatas incrementa los niveles de expresión de estos mismos neuropéptidos y de sustancia P (y sus correspondientes mRNAs) en neocorteza, además de incrementar los niveles de NPY en tálamo, hipocampo y estriado (Nawa et al 1994). Paralelamente, se ha observado una disminución drástica de los niveles de NPY en corteza e hipocampo en ratones transgénicos en los que se ha suprimido la expresión de esta neurotrofina (*Bdnf*<sup>-/-</sup>) (revisado en Snider 1994).

En el caso más concreto de la participación de BDNF en el hipotálamo de rata, se ha visto que, en cultivos primarios fetales (E17) de tal región, BDNF (pero no NT3 ni NGF) estimula la producción de SRIH (Rage et al 1999), pero solamente en la subpoblación de neuronas SRIHérgicas hipofisiotrópicas del núcleo periventricular, y no en las interneuronas SRIHérgicas del núcleo arcuato (Loudes et al 2000).

Finalmente cabe mencionar que, en experimentos realizados en nuestro grupo, la adición de BDNF a cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata incrementa los niveles de expresión del mRNA del péptido hormona liberadora de tirotrópina (TRH; ver adelante) sin afectar la supervivencia de las neuronas, mientras que NT3 no tiene efecto alguno sobre la expresión de ese mRNA, a pesar de que por medio de ensayos de western blot e inmunohistoquímica se ha comprobado la presencia de los receptores TrkB<sup>TK+</sup> y TrkC<sup>TK+</sup> en estas células. De hecho, el incremento del mRNA de TRH al agregar BDNF sólo tiene lugar en aquellas células TRHérgicas que expresan el mRNA de TrkB (Guerra-Crespo et al, en prensa).

### **Expresión de las neurotrofinas y sus receptores en el núcleo paraventricular del hipotálamo**

Las neurotrofinas se expresan ampliamente en el sistema nervioso desde etapas muy tempranas del desarrollo y hasta etapas adultas. Los transcritos de NGF, BDNF y NT3 pueden

encontrarse ya, en la rata, desde el día 11 de desarrollo embrionario (E11)<sup>1</sup>, y entre E11 y E12 experimentan un incremento dramático en sus niveles de expresión, alcanzando los niveles más altos en el hipocampo (Maisonpierre et al 1990). En el sistema nervioso central, en contraposición al sistema nervioso periférico, la cantidad y la distribución de BDNF y de NT3 (y de sus receptores) es mucho mayor que la de NGF y TrkA (Johnson 1999).

El mRNA de TrkB, analizado mediante 'northern blot' a partir de RNA total de embriones de ratón, se detecta desde E9<sup>2</sup>, y en E10 se puede observar mediante ISH en el prosencéfalo, el mesencéfalo caudal, el rombencéfalo, médula espinal, aorta dorsal, y en las células que formarán los ganglios de la raíz dorsal (DRG) (Klein et al 1990b). La expresión del mRNA de TrkC es detectable, también por ISH en ratones, desde E8 en el neuroectodermo, en E10 a lo largo del neuroepitelio (Tessarollo et al 1993), y desde E12, edad en que son ya distinguibles las cinco vesículas secundarias cerebrales, se detecta en niveles bajos en el diencefalo (entre otras estructuras) (Tessarollo et al 1993, Lamballe et al 1994). El mRNA de TrkA durante el desarrollo se expresa únicamente en ganglios sensoriales craneales y en los ganglios de la raíz dorsal (Martín-Zanca et al 1990), y en relación al patrón de expresión de p75NTR no hay reportes completos a la fecha.

El núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) (Fig 6), localizado en la subdivisión medial y anterior de esa estructura diencefálica (revisado en Card et al 1999), posee algunos grupos neuronales que proyectan sus axones hacia la eminencia media, liberando desde ahí a la circulación portal hipofisiaria diferentes sustancias capaces de influir en la función de la hipófisis anterior (revisado en Armstrong 1985, Card et al 1999). Uno de estos grupos lo forman las neuronas parvocelulares productoras de TRH, la cual es un tripéptido (pGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) que regula la síntesis y liberación hipofisiaria de tirotrópina y de prolactina (ver p.ej. las revisiones de O'Leary y O'Connor 1995 y Joseph-Bravo et al 1998). Además de las células TRHérgicas neuroendócrinas, en la subdivisión parvocelular del PVN hay también neuronas productoras de hormona liberadora de corticotropina (CRH) (Card et al 1999).

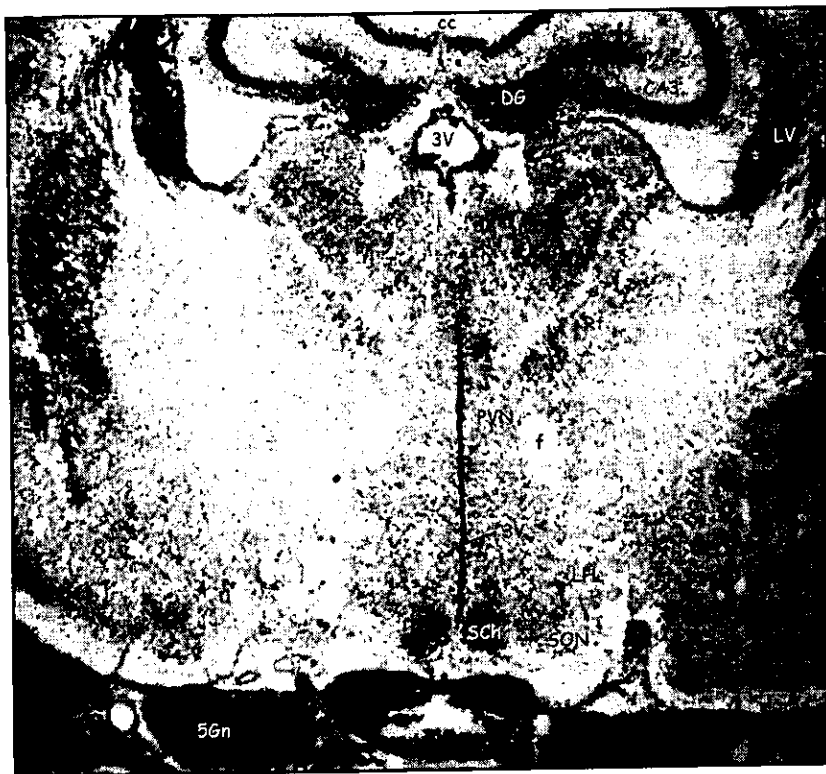
En el PVN de rata adulta se ha demostrado tanto la presencia de los mRNAs de TrkB (aunque con sondas que no distinguen TrkB<sup>TK+</sup> de sus isoformas no catalíticas) (Merlio et al 1992, Kernie et al 2000) y de BDNF (Castren et al 1995, Conner et al 1997, Kernie et al 2000), los cuales colocalizan en un porcentaje elevado de células (al menos en el PVN de roedores jóvenes; Miranda et al 1993), así como de las proteínas que éstos codifican (Conner et al 1997, Yan et al 1997). En nuestro grupo hay datos que sugieren que es el mensajero de la isoforma catalítica del TrkB el que está presente en el PVN de la rata adulta (RM Uribe, sin publicar). También hay mRNA de TrkC en el PVN de la rata (Merlio et al 1992); sin embargo,

---

<sup>1</sup> En nuestro laboratorio consideramos como E1 al día que sigue a la noche de apareamiento. Algunos otros grupos consideran al primer día de gestación como E0 o E0.5. Con el fin de hacer comparables los diferentes estudios publicados, en los datos citados en este trabajo he ajustado la información de modo que coincida E1 como el primer día de gestación.

<sup>2</sup> En general, para comparar el desarrollo embrionario entre rata y ratón, puede agregarse un día a la fecha definida en aquella para obtener el equivalente murino.





**FIGURA 6.** Microfotografía a bajo aumento de un corte coronal de cerebro de rata de un día de vida postnatal a nivel del PVN, teñido con hematoxilina. Están indicadas algunas estructuras anatómicas relevantes.

3V	tercer ventrículo
5Gn	ganglio del V par craneal
CA3	área CA3 del hipocampo
cc	cuerpo caloso
DG	giro dentado
f	fórnix
LH	núcleo hipotalámico lateral
LV	ventrículo lateral
PVN	núcleo paraventricular del hipotálamo
Rt	núcleo reticular del tálamo
SCh	núcleo supraquiasmático
SON	núcleo supraóptico

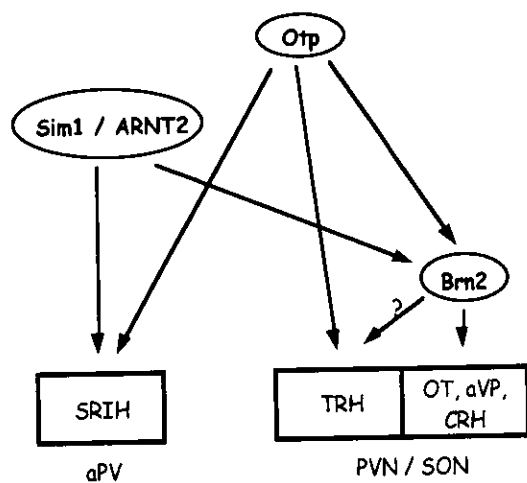
el mRNA de TrkA no se ha encontrado ni en el PVN (Merlio et al 1992) ni en ninguna otra área del hipotálamo de rata adulta (Holtzman et al 1992, Gibbs y Pfaff 1994), aunque sí ha sido descrito en algunas células del PVN de roedores de 9-10 días de edad postnatal, al igual que el mRNA de NGF (pero no de NT3) (Miranda et al 1993). En cuanto al receptor p75NTR, el mRNA que lo codifica se ha encontrado en el PVN de rata adulta (Miranda et al 1993), y células inmunoreactivas a tal receptor en este mismo núcleo han sido encontradas en humanos en edad senil (Moga y Duong 1997). La información que se tiene con respecto a la expresión de NT4 en esta región es poca, pero se sabe por ensayos de protección a RNAsa que el mRNA de esta neurotrofina se expresa en el hipotálamo de ratas adultas (Timmusk et al 1993), y se ha observado inmunoreactividad para NT4 en fibras de los núcleos hipotalámicos arcuato y periventricular (Friedman et al 1998).

### **Desarrollo del núcleo paraventricular hipotalámico y diferenciación de las neuronas TRHérgicas**

Durante el desarrollo embrionario, la porción craneal del tubo neural experimenta segmentaciones progresivas, generando regionalización del sistema nervioso central (revisado en Kintner y Lumsden 1999). En el caso del diencefalo, éste se subdivide en cuatro regiones llamadas neurómeros D1-D4 (numerados en secuencia ántero-posterior), que además de ser morfológicamente distinguibles, es posible definirlos también en función de diferentes dominios de expresión de ciertos genes regulatorios (Figdor y Stern 1993). El hipotálamo

deriva del neurómero D1 (Figdor y Stern 1993), y las células que forman a los diferentes núcleos que lo componen tienen su origen en el neuroepitelio del tercer ventrículo (Card et al 1999), desde donde migran para ir formando primero los núcleos ubicados en sentido más lateral y luego aquellos núcleos mediales (gradiente lateral-medial) (Ifft 1972, Altman y Bayer 1978a).

Conforme procede la embriogénesis, los dominios regionales de expresión de algunos genes regulatorios son cada vez más específicos, participando en el proceso de diferenciación celular. En el hipotálamo existen evidencias recientes del papel de diferentes factores de transcripción en la definición progresiva de los fenotipos neuroendócrinos (Fig 7) (revisado en Burbach 2000). Así, el gen *Ortopedia (Otp)*, de la familia homeobox, se expresa en dominios restringidos del diencéfalo murino desde el día E10. Más adelante, en E13, también en ratón, se localiza en áreas del hipotálamo, y después del día E17 se transcribe únicamente en las regiones preóptica y postóptica que dan origen a ciertos núcleos hipotalámicos neuroendócrinos (Simeone et al 1994). Estos núcleos que expresan *Otp* son el PVN, productor de las hormonas TRH, CRH, oxitocina (OT) y arginina-vasopresina (aVP); el núcleo supraóptico (SON), que secreta también OT y aVP; y el núcleo anterior periventricular (aPV), que expresa SRIH (Wang y Lufkin, 2000). De hecho, en ratones mutantes *Otp*<sup>-/-</sup> no se forman los núcleos aPV, PVN ni SON, y además no se expresan los péptidos CRH, TRH, aVP, OT y SRIH en el hipotálamo (Acampora et al 1999) desde el día E16, lo que sugiere una falla en la diferenciación terminal de estos núcleos (Wang y Lufkin, 2000).



**FIGURA 7.** Algunos factores de transcripción (óvalos) que participan en el establecimiento del fenotipo neuroendócrino (rectángulos) en neuronas hipotalámicas. (Fuente: adaptado de Burbach 2000, pp 57)

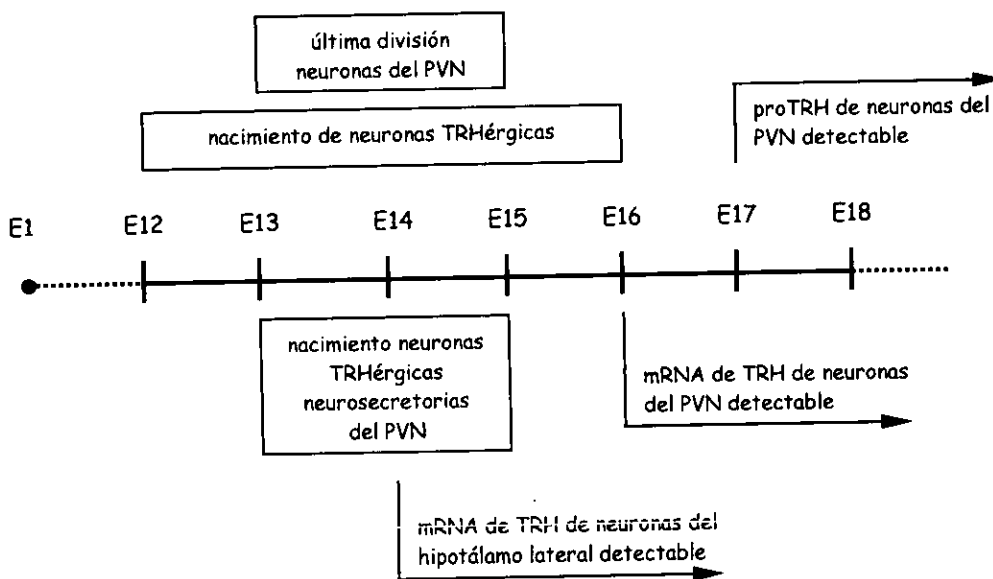
<b>aPV</b>	núcleo anterior periventricular
<b>aVP</b>	arginina-vasopresina
<b>CRH</b>	hormona liberadora de corticotropina
<b>OT</b>	oxitocina
<b>PVN</b>	núcleo paraventricular
<b>SON</b>	núcleo supraóptico
<b>SRIH</b>	hormona liberadora de tirotrópina

*Sim1* es un factor transcripcional de la familia bHLH-PAS que en ratones está ya presente al nacimiento en el PVN (magno- y parvocelular), aPV y SON (Michaud et al 1998), forma heterodímeros con *Arnt2* (Michaud et al 2000), y cuyos mutantes homocigóticos presentan hipocelularidad generalizada en el PVN y el SON, con la consecuente ausencia de OT, aVP, TRH, CRH y SRIH (Michaud et al 1998, Hosoya et al 2001). Los ratones *Sim1*<sup>+/-</sup> sí expresan esas mencionadas hormonas, pero el PVN es hipocelular y desarrollan hiperfagia y obesidad (Michaud et al 2001). En un reporte reciente se describe una traslocación balanceada en humanos (entre los cromosomas 1p22.1 y 6q16.2) en la que se ve interrumpido el gen *Sim1*, lo cual causa igualmente obesidad (Holder et al 2000).

Finalmente, un factor de transcripción de la familia POU, *Brn2*, cuya expresión depende en el PVN y SON de *Sim1* (Michaud et al 1998),

participa también en la diferenciación terminal de ciertos fenotipos neuroendócrinos. Ratones *Brn2*<sup>-/-</sup> carecen de producción de CRH, aVP y OT (Schonemann et al 1995), y probablemente también carecen de TRH (o al menos no se detecta en la eminencia media; Nakai et al 1995).

Morfológicamente, el PVN en las ratas comienza a ser identificable en la pared del tercer ventrículo en el día 17 de gestación (E17) (Hyypä 1969, Altman y Bayer 1978b), aunque es hasta E18 cuando puede distinguirse con claridad del tejido que le rodea; al nacimiento dicha morfología corresponde ya con la del PVN adulto (Hyypä 1969). Sin embargo, las características estructurales y funcionales de las diferentes neuronas son adquiridas desde antes de participar en esta conformación morfológica mencionada (Altman y Bayer 1978b). Así, el ‘nacimiento’ (última división) de las neuronas del PVN, definido mediante la administración de timidina tritiada a ratas gestantes, ocurre entre los días E13 y E15 (Altman y Bayer 1978a), con el pico de generación de éstas en el día E14 (Ifft 1972, Altman y Bayer 1978a). Estos datos han sido refinados recientemente mediante la utilización de triples marcajes en donde se combina la inmunohistoquímica para identificar el fenotipo neuronal y la incorporación de BrdU (administrado durante la gestación) en éstas, más el uso de un marcador intra-axonal retrógrado para identificar a las neuronas que proyectan sus axones a la eminencia media. Así, se ha confirmado que tanto las neuronas TRHérgicas como las CRHérgicas neurosecretorias del PVN nacen entre los días E13 y E15, con el pico de generación en E14, aún cuando las neuronas TRHérgicas hipotalámicas en general nazcan a lo largo de un periodo más amplio, entre los días E12 y E16 (Markakis y Swanson 1997).



**FIGURA 8.** Cronología del desarrollo del PVN en la rata y diferenciación de neuronas TRHérgicas del mismo. (Fuente: realizado con información de Ifft 1972, Altman y Bayer 1978a, Burgunder y Taylor 1989, Okamura et al 1991, Markakis y Swanson 1997)

Por otro lado, haciendo uso de técnicas de ISH, es posible detectar al mRNA de TRH en el hipotálamo de rata desde el día E14, en la zona que conformará al hipotálamo lateral. El mRNA de TRH en el PVN comienza a ser detectable a partir de E16 (Burgunder y Taylor 1989), al igual que el de CRH (Fujioka et al 1999), y los niveles de aquél tienden a elevarse progresivamente hasta los 7 días de vida postnatal, edad a partir de la cual empieza a sujetarse a regulación negativa por las hormonas tiroideas (Taylor et al 1990). En concordancia con estos datos, las neuronas del PVN de rata inmunoreactivas a proTRH son detectables a partir del día E17 de desarrollo (Okamura et al 1991) (Fig 8), aún cuando las terminales nerviosas inmunoreactivas a esta hormona entren en contacto con los vasos sanguíneos del sistema porta-hipofisiario hasta el día dos de desarrollo postnatal (P2) (Shioda y Nakai 1983).

Los patrones de expresión de las neurotrofinas o sus receptores en los diferentes núcleos hipotalámicos durante el desarrollo no están bien definidos. Mediante western blot se ha detectado la presencia de NT3 y BDNF en extractos tisulares fetales de rata (E17) de los núcleos periventricular y arcuato (Loudes et al 1999), pero no hay reportes en relación al PVN. En extractos de hipotálamo, también de ratas en E17 del desarrollo, se ha demostrado la presencia de los mRNAs de TrkB y de TrkC, y se ha confirmado por western blot la presencia de los receptores catalíticos correspondientes (aunque TrkC<sup>TK+</sup> en cantidades bajísimas). De las isoformas de TrkB, la catalítica es la mayoritaria, aunque también se detecta la isoforma no catalítica (Guerra-Crespo et al, en prensa). Adicionalmente, se sabe que, en el PVN, el mRNA TrkC es detectable con técnicas de ISH a partir del día E16 del desarrollo (Fujioka et al 1999, Hassink et al 1999), pero no hay datos que describan la expresión de TrkB ni p75NTR (o sus mRNAs) en el PVN en edades fetales.

## Justificación

---

Los diferentes ejemplos del papel que el BDNF juega en la adquisición de determinados fenotipos peptidérgicos; el hecho de que tanto esta neurotrofina como su receptor TrkB estén presentes en el PVN de las ratas adultas; y los resultados *in vitro* que se han obtenido en nuestro grupo en relación al incremento en la expresión del mRNA de TRH gracias a BDNF en cultivos de hipotálamo fetal de rata, apuntan a pensar en la influencia que esta neurotrofina, actuando a través de su receptor TrkB<sup>TK+</sup>, pudiera tener sobre la definición fenotípica de las células neurosecretorias TRHérgicas del PVN. Una condición que, si este fuera el caso, sería de esperar que se cumpliera, es que el receptor TrkB<sup>TK+</sup> debería coincidir *espacialmente* con la región de las neuronas TRHérgicas del PVN, pero expresarse *antes* de que éstas establezcan su fenotipo. Como un primer paso para aclarar esta situación, en el presente proyecto se ha intentado definir los patrones espacio-temporales de expresión de los mRNAs de TrkB<sup>TK+</sup> y de TRH en el PVN durante diferentes etapas del desarrollo embrionario.

## Objetivo

---

Comparar mediante técnicas de hibridación *in situ* el patrón espacio-temporal de expresión de los mRNAs que codifican para TRH y para el receptor a neurotrofinas TrkB<sup>TK+</sup> en el núcleo paraventricular del hipotálamo de rata durante los días E14, E16, E18 y P1 del desarrollo.

## Estrategia Experimental

---

Utilizamos técnicas de hibridación *in situ* (ISH) para determinar la expresión de los mensajeros que codifican al receptor TrkB<sup>TK+</sup> y a la hormona TRH. Debido a la necesidad de reconocer únicamente al mRNA del receptor catalítico TrkB y excluir la detección de cualquiera de sus isoformas no catalíticas, utilizamos oligodeoxinucleótidos en vez de sondas de cRNA o cDNA, que hubieran sido una alternativa en otras circunstancias (Kadkol et al 1999). Una sonda que reconociera la porción extracelular del receptor no sería capaz de distinguir a las formas TK- de la TK+. Por otro lado, una sonda de cRNA o cDNA dirigida contra la región citoplásmica del receptor catalítico tendría más posibilidades de generar señales inespecíficas que una sonda más corta, dada la alta homología que existe entre las regiones catalíticas de los diferentes receptores tirosina cinasa (Barbacid 1995, Hubbard 1999). Para identificar al mRNA de TRH también usamos oligodeoxinucleótidos, puesto que el proceso de ISH inicialmente escogido exigía utilizar sondas de características similares (en cuanto a longitud y Tm) para poder hibridar con ambas sondas simultáneamente.

La desventaja más clara de usar oligodeoxinucleótidos como sondas es que suelen ser menos sensibles que sus contrapartes más largas (ver p. ej. Mis et al 1999, Luehrsen et al 2000). Siendo además esperable que al inicio de la ontogenia de cualquier mRNA los niveles de expresión de éste sean bajos, decidimos usar simultáneamente dos oligodeoxinucleótidos dirigidos contra regiones diferentes del mRNA de TRH.

En un principio marcamos los oligodeoxinucleótidos con fluorocromos con espectro de emisión distintos, de modo que pudieran ser colocalizados a nivel celular ambos mRNAs. Sin embargo este método no dió resultado, por lo que marcamos con <sup>35</sup>S las sondas ya que la hibridación isotópica es el método de ISH más sensible (Kadkol et al 1999). Cortes contiguos se hibridaron con los diferentes oligodeoxinucleótidos de modo que pudiera establecerse una relación regional entre los diferentes patrones de expresión de los mRNAs.

Los embriones utilizados fueron de 14, 16 y 18 días de gestación, y los resultados de las ISHs respectivas se compararon con las realizadas en cerebros de ratas en el primer día de vida postnatal y en adultos.

## **Materiales y Métodos**

---

### **Animales**

Se utilizaron ratas Wistar, las cuales fueron decapitadas en los días 14, 16 ó 18 de gestación, considerando como el primer día de gestación (E1) al siguiente del apareamiento<sup>3</sup>. Los embriones se extrajeron de inmediato, siendo congelados en hielo seco (E14 y E16), o bien decapitados y su cabeza congelada del mismo modo (E18). Adicionalmente utilizamos ratas recién nacidas (P1) y adultas, las cuales fueron igualmente decapitadas y sus cabezas congeladas en hielo seco tras retirárseles la piel (P1), o se retiró el cráneo, se extrajo el cerebro y se congeló (ratas adultas). Una vez congelados, tanto los embriones como las cabezas o los cerebros fueron envueltos en Parafilm (American National Can, USA) y en papel aluminio, y almacenados a -70°C hasta ser procesados.

Posteriormente se hicieron cortes coronales de 12 µm de espesor a lo largo del PVN (de acuerdo con el Atlas de Paxinos et al 1994 para los embriones y neonatos, o el Atlas de Paxinos y Watson 1986 para los adultos) en criostato (Bright Instrument Company Ltd, UK) a -18°C, los cuales fueron montados sobre laminillas gelatinizadas (ver Anexo 1) y almacenados a -70°C. El número de cortes obtenidos fue aproximadamente de 25 para E14, 44 para E16, 16 para E18, 36 para P1 y 48 para los adultos. La razón para haber obtenido un número grande de cortes en E14 y E16 es que se pensó en incluir las áreas del hipotálamo en las que se ha reportado la expresión del mRNA de TRH en estas edades (Burgunder y Taylor 1989), que son áreas diferentes de las que dan lugar al PVN. Por otro lado, a partir de E18 los cortes incluyen solamente al PVN.

### **Sondas**

Se sintetizaron cinco oligodeoxinucleótidos ('oligos') (sintetizador automático Applied Biosystems 391, Unidad de Síntesis, Instituto de Biotecnología UNAM): el TrkB, dirigido contra un segmento de la región 3' no traducida del mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> de rata (región cuya secuencia es distinta en los TrkB<sup>TK-</sup>); el TrkB/c, que reconoce al mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> de rata en la región catalítica (Fig 9) y se usó como control positivo; dos diferentes que reconocen al mRNA de TRH de rata (denominados TRH317 y TRH1245), y un oligo que no reconoce a ningún mensajero (oligo 'random'; RNDM), utilizado como control negativo (ver Anexo 2 para las secuencias). El diseño se basó en las secuencias publicadas por Lechan et al (1986) para TRH (número de acceso GenBank M12138) y por Middlemas et al (1991) para TrkB<sup>TK+</sup> (número de acceso GenBank M55291), con ayuda del software Oligo (v4.03; National Biosciences Inc, MN, USA). La posible hibridación de los oligos con secuencias homólogas se descartó mediante el uso del software Blastn 2.0.12 (National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

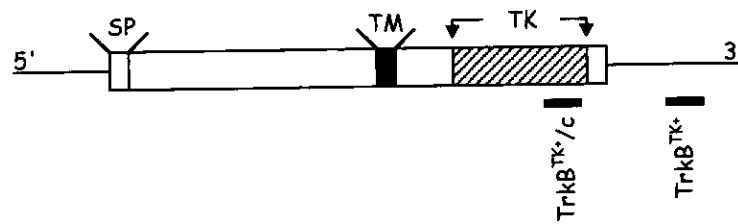
---

<sup>3</sup> El macho y la hembra comparten la jaula desde las 14:00 hrs hasta las 8:00 hrs del día siguiente.

Tras ser sintetizados, los oligos fueron evaluados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 19% (en urea 8 M y 1x TBE [buffer tris-borato-EDTA], 360 V x 90 min) para confirmar el tamaño y la limpieza.

Cada uno de estos oligos fue marcado en su extremo 3'-OH con  $\alpha[^{35}\text{S}]d\text{ATP}$  (1250 Ci/mmol) (NEN Life Science Products) mediante una reacción catalizada por la enzima terminal deoxinucleotidil transferasa (EC 2.7.7.31; Boehringer, no. cat. 220

582) (Anexo 5), y se verificó la eficiencia de dicho marcaje de acuerdo al protocolo descrito en el Anexo 6. El porcentaje de incorporación fue de 72-91%, y la actividad específica resultante fue de  $6 \times 10^8$  cpm/ $\mu\text{g}$ . Además, después de marcados los oligos se sometieron a análisis electroforético (PAGE 19% en urea 8 M y 1x TBE, 360 V x 90 min) con autoradiografía.



**FIGURA 9.** Representación esquemática del mRNA de  $\text{TrkB}^{\text{TK}+}$ . La barra representa las secuencias codificadoras, y la línea las secuencias no traducidas. Se indican los dominios del péptido señal (SP), transmembranal (TM), y catalítico (TK). Las líneas gruesas en la parte inferior representan la posición relativa de los oligos utilizados. (Fuente: adaptado de Klein et al 1990a)

## Hibridación *in situ*

### FIJACIÓN

Los cortes de tejido fueron secados a temperatura ambiente (TA) con la ayuda de una secadora manual de aire, y fueron entonces fijados, de acuerdo con el siguiente protocolo:

- Utilizar solamente agua desionizada (MilliQ, Millipore), recolectada en frascos previamente horneados, y esterilizada durante 30 min a 120 °C, 20 psi.
- El material de vidrio (Pyrex y análogos) se hornea a 180 °C durante 12 hrs.
- El material de metal, el de vidrio que no pueda hornearse, el de plástico, y los agitadores magnéticos se autoclavean a 120 °C, 20 psi, 30 min.
- Fijación en paraformaldehído 4% durante 10 minutos (en los Anexos 3 y 4 puede consultarse sobre los reactivos y soluciones utilizadas).
- Dos lavados en 1x PBS durante 5 minutos.
- Acetilación durante 10 min (en solución de acetilación).
- SSC 2x durante 2 minutos.
- Deshidratación durante 2 min en cada uno de los siguientes alcoholes etílicos: 75%, 80%, 95% y 100% (en ese orden).
- Deslipidación en cloroformo 100% durante 10 min.
- Etanol 100% durante 2 min, y etanol 95% otros 2 min.
- Se dejan secar a TA.



- Una vez fijados, los tejidos pueden guardarse a  $-70^{\circ}\text{C}$  para proceder posteriormente a la hibridación. En el momento que se vayan a utilizar, secarlas nuevamente con secadora.

#### **HIBRIDACIÓN**

La hibridación de los tejidos se llevó a cabo como se describe a continuación, de acuerdo con protocolos previamente ensayados en nuestro grupo (Sánchez et al 1997), usando para tal efecto cada uno de los oligos marcados (excepto para el caso de TRH, en el que ambos oligos —TRH317 y TRH1245— se utilizaron simultáneamente con el fin de incrementar la señal) en laminillas adyacentes.

- Desnaturalizar el oligo ( $65^{\circ}\text{C}$ , 10 min).
- Precalentar a la temperatura de hibridación ( $42^{\circ}\text{C}$ ) la mezcla de hibridación (en la incubadora).
- Por cada ml de mezcla de hibridación, adicionar 150 ng de cada oligo marcado.
- De esta última mezcla se colocan 40-50  $\mu\text{l}$  sobre el tejido (a temperatura ambiente).
- Se recorta Parafilm en cuadros, de modo que sea del tamaño suficiente para cubrir al tejido pero que no salga del portaobjetos. Tras colocarlo sobre el tejido, se oprime ligeramente con unas pinzas para que la mezcla de hibridación quede distribuida homogéneamente sobre todo el corte y no queden burbujas de aire atrapadas.
- Preparar una cámara húmeda con una solución de formamida:agua 1:1, y colocar en ella las laminillas.
- Incubar durante 12 hrs a  $42^{\circ}\text{C}$ .

#### **LAVADOS POST-HIBRIDACIÓN**

- Retirar el Parafilm de las laminillas con 1x SSC a temperatura ambiente.
- Lavar en 1x SSC a temperatura ambiente por 15 min. Repetir.
- Dos lavados de 30 min c/u en 1x SSC + 50% formamida a  $45^{\circ}\text{C}$ .
- Dos lavados de 30 min c/u en 0.1 x SSC + 0.02% SDS a  $45^{\circ}\text{C}$ .
- Enjuagar brevemente en agua.
- Deshidratar las muestras en etanol 75%, 80% y 95% (dos minutos en c/u).
- Dejar secar a temperatura ambiente.

#### **EMULSIÓN Y REVELADO**

Una vez secas y en condiciones de absoluta oscuridad, las laminillas se expusieron por contacto directo durante 5 días a una película para autoradiografía (Kodak Biomax MR, no. cat. 892 9655) con el fin de verificar el éxito del proceso de hibridación. Las laminillas fueron posteriormente recubiertas de emulsión fotográfica (Kodak NTB2, no. cat. 165 4433) diluida en agua 1:1 y previamente fundida a  $45^{\circ}\text{C}$ , también en condiciones de oscuridad, y se dejaron secar en posición vertical a TA por un mínimo de 3 horas. Se almacenaron en cajas negras con desecador a  $4^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de exposición a la emulsión fué de 60 días para los embriones y neonatos, y de 17 días para los adultos.

Las laminillas se colocaron entonces a TA durante una hora y se procedió al revelado, en condiciones de oscuridad. Los reactivos se diluyeron de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y el procedimiento fue el siguiente:

- Revelador (D19 Kodak, no. cat. 146 4593), 2 min a 15°C.
- Agua, 1 min a 15°C.
- Fijador (GBX Kodak, no. cat. 190 1875), 4 min a 15°C.
- Agua, 15 min en agitación a TA (sin necesidad ya de hacerlo en condiciones de oscuridad).
- Se dejan secar a TA.
- Se tiñen y montan.

#### **TINCIÓN**

El método de tinción que utilizamos fue el de hematoxilina, del siguiente modo:

- Etanol 100%, 2 min.
- Etanol 95%, 2 min.
- Enjuagar brevemente en agua.
- 4 min en hematoxilina (previamente filtrada con papel Whatman no. 1).
- Enjuagar en agua.
- Etanol 95%, 2 min.
- Etanol 100%, 2 min.
- Xilol, 3 min.
- Montaje de inmediato con Cytoseal 60 (Stephens Scientific, no. cat. 8310-16) y cubreobjetos del no. 1 (Esco, Erie Scientific Company).

## Resultados

### Hibridación *in situ* fluorescente

La estrategia inicial consistió en realizar ISHs marcando los oligos con nucleótidos acoplados a fluoróforos haciendo uso de la reacción de terminal transferasa descrita previamente para los nucleótidos radioactivos. Alternativamente, para tratar de amplificar la señal, marcamos los oligos con nucleótidos con digoxigenina o biotinilados, para luego hacerlos visibles al microscopio de fluorescencia con el uso de anticuerpos anti-biotina o anti-digoxigenina acoplados a algún fluoróforo. El objetivo de estas estrategias era intentar colocalizar a ambos mensajeros —el de TrkB<sup>TK+</sup> y el de TRH— en el PVN, y hacer una descripción del patrón de colocalización de éstos a nivel *celular* y no sólo *regional* a lo largo del desarrollo.



**FIGURA 10.** Microscopía de fluorescencia (400x) que muestra un grupo representativo de células del PVN de rata adulta (no sometidas a ISH) que presentan autofluorescencia. Nótase el patrón granular perinuclear en algunas de ellas (flechas).

No nos fue posible obtener resultados haciendo uso de estas técnicas. Los tejidos evaluados presentan autofluorescencia<sup>4</sup> en forma de gránulos localizados en el citoplasma (Fig 10), aún antes de ser sometidos a cualquier procedimiento. Intentamos resolver este problema tratando los tejidos de embriones y neonatos con diferentes proteasas, incubándolos con agentes de bloqueo (albúmina, suero, leche o reactivos comerciales a diferentes concentraciones), y/o pre-incubándolos con concentraciones variables de detergentes. Ninguno de estos protocolos dió resultado, e invariablemente la señal potencial de nuestros oligos era indistinguible de tal autofluorescencia.

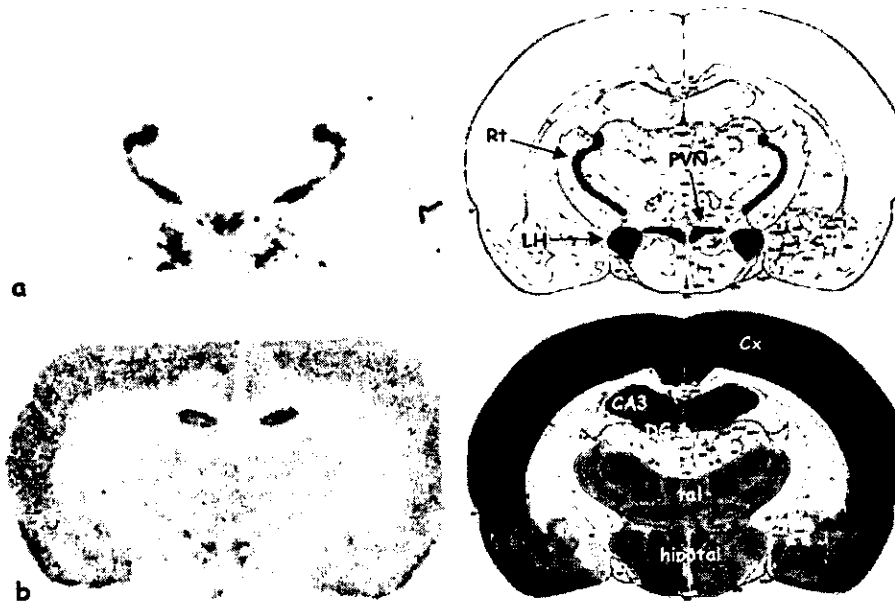
Por tal motivo decidimos hibridar con oligos radioactivos, con el inconveniente de no poder colocalizar ambos mensajeros a nivel celular y por lo tanto obtener conclusiones únicamente de lo observable a nivel regional. Por otro lado, el uso de señales radioactivas demostró buena sensibilidad y un amplio margen entre el ruido de fondo y la señal obtenida (ver adelante).

### Especificidad de los oligodeoxinucleótidos

La especificidad del oligo TRH317 está ya establecida en el laboratorio, pues se ha utilizado antes (Sánchez et al 1997). Con el oligo TRH1245 se realizaron ISHs en adulto, y se compararon con aquéllas realizadas con el oligo TRH317. La distribución del mRNA de TRH resultó igual en ambos casos (resultado no mostrado). También se hibridaron cortes de adulto con ambos oligos de TRH, demostrándose que la distribución del mensajero corresponde a la observada previamente en nuestro grupo y a la descrita por otros grupos (revisado en Lechan y Toni 1992) (Fig 11a).

<sup>4</sup> Llevamos a cabo las observaciones en un microscopio (Zeiss Axioskop) de fluorescencia equipado con lámpara de mercurio y filtros para rodamina y fluoresceína. Con ambos filtros se observa la autofluorescencia.

Las hibridaciones con el oligo TrkB en cortes de adulto demostraron un patrón de expresión del mRNA igual al reportado por otros grupos para el cerebro en general al nivel en que nuestros cortes están hechos (Klein et al 1990a,b, Kokaia et al 1993) (Fig 11b). De particular utilidad resultó el patrón de hibridación en los DRG y en el ganglio del V par



**FIGURA 11.** Autoradiografías de cortes coronales contiguos (a, b) de un cerebro de rata adulta a nivel del PVN, hibridadas con ambos oligos de TRH (a) o con el oligo TrkB<sup>TK+</sup> (b). Para referencia, a la derecha de cada imagen se esquematiza el corte, destacando los sitios en donde la señal es positiva. Los esquemas son del Atlas de Paxinos y Watson (1996), y el sombreado en éstos fue añadido con ayuda del software Adobe Photoshop 6.0.

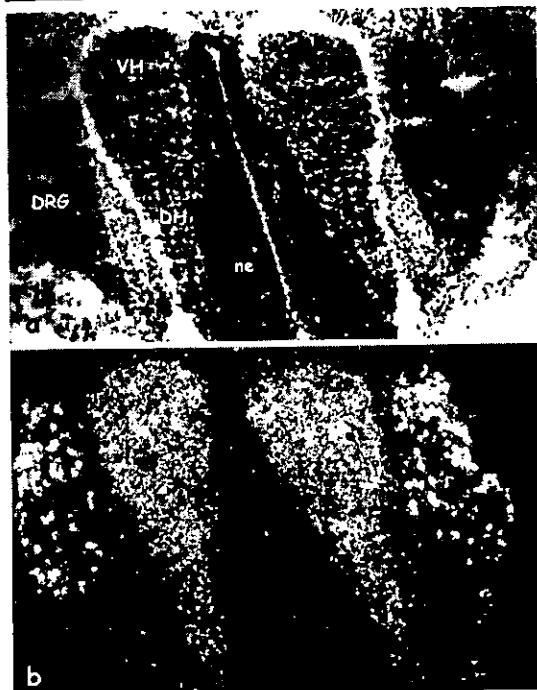
<b>BG</b>	ganglios basales	<b>DG</b>	giro dentado	<b>PVN</b>	núcleo paraventricular del hipotálamo
<b>Cx</b>	corteza cerebral	<b>hipotal</b>	hipotálamo	<b>Rt</b>	núcleo reticular del tálamo
<b>CA3</b>	área CA3 del hipocampo	<b>LH</b>	hipotálamo lateral	<b>tal</b>	tálamo

craneal: en estas regiones del sistema nervioso, la expresión del mensajero de TrkB se restringe a ciertas subpoblaciones de neuronas, lo cual confiere un aspecto característico (Fig 12), y además este patrón es ya claro desde desde el día 14 del desarrollo embrionario (en ratón) (Klein et al 1990b), lo que lo hace útil como control positivo de nuestra sonda en las hibridaciones en embriones. Adicionalmente, se hicieron ISHs con otro oligo de TrkB, el oligo TrkB/c, cuyo patrón de hibridación se mostró equivalente al del oligo TrkB (no se muestra). Aquél oligo, sin embargo, no se usó más, y en adelante los resultados que se muestran son únicamente con el oligo TrkB mencionado.

En las hibridaciones con el oligo RNDM se observa solamente una discreta señal de fondo distribuída homogéneamente, de modo que es un control negativo adecuado (Fig 13).

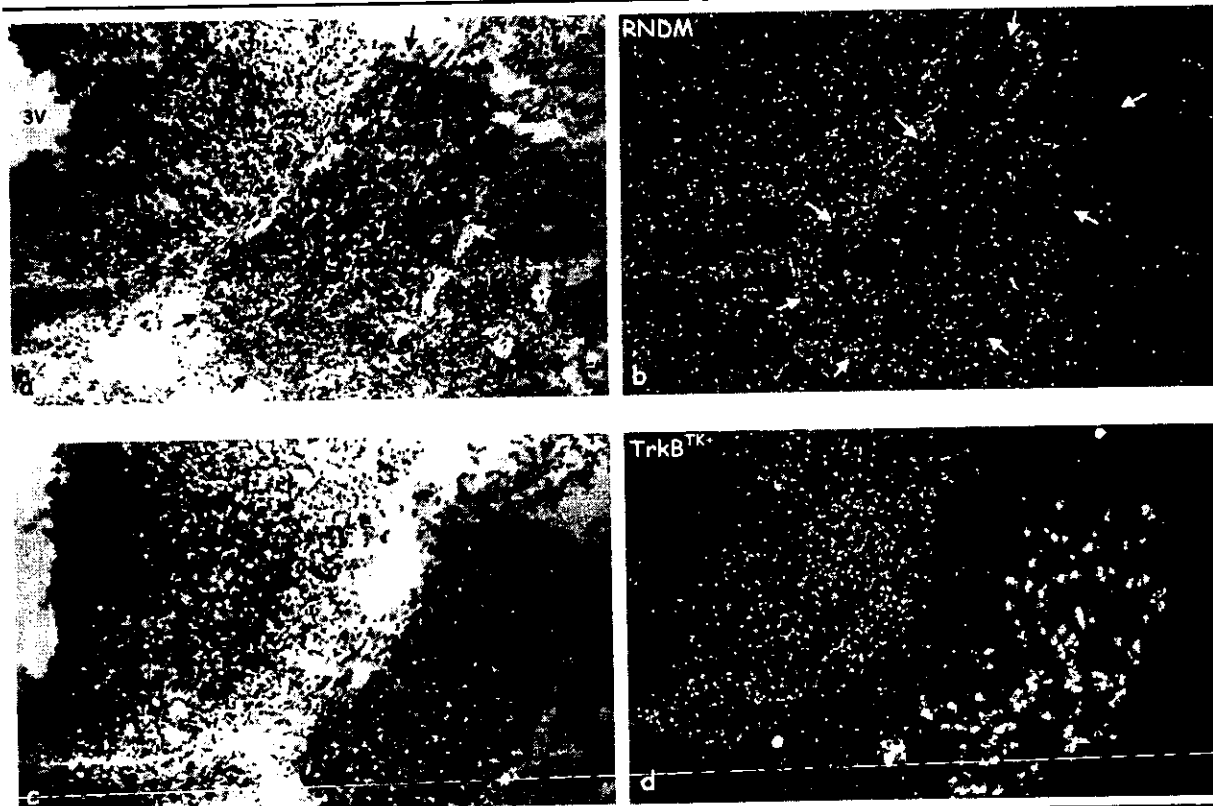
### Expresión del mRNA de TRH en el hipotálamo medio

A la edad de E14, que fue la más temprana que estudiamos, el mRNA de TRH está claramente presente en un grupo muy localizado de células en la zona que corresponde al hipotálamo lateral (LH), cercanas al neuroepitelio del lóbulo diencefálico (Fig 14b). Las células que son positivas expresan al mensajero abundantemente, a juzgar por la gran cantidad de granos de plata visibles.

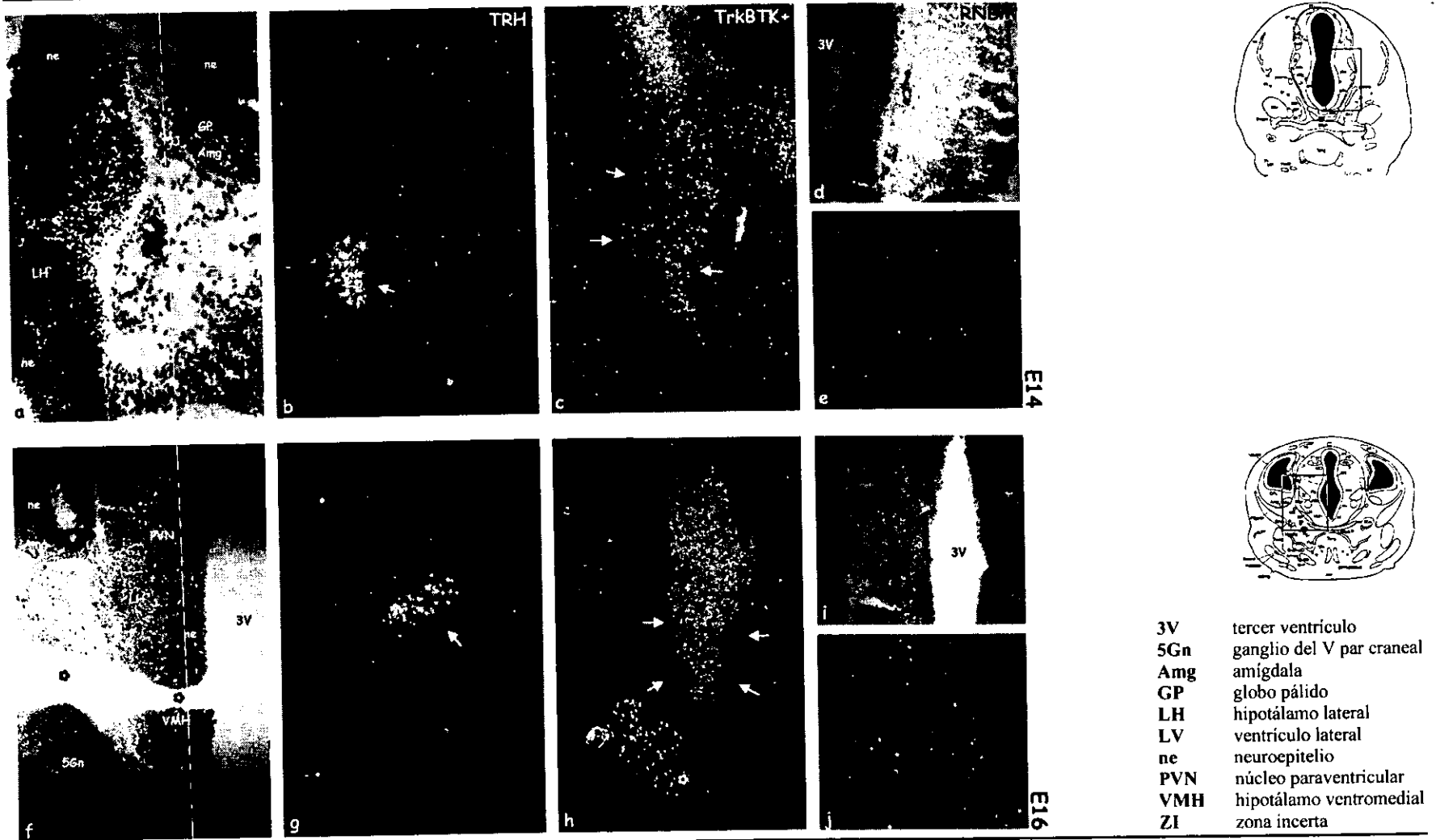


**FIGURA 12.** Distribución de  $TrkB^{TK+}$  en los DRGs. Corte transversal de la médula espinal de un embrión (E14) en campo claro (a) y campo oscuro (b) (100x), donde se muestra el patrón característico de expresión del mRNA de  $TrkB^{TK+}$  en subgrupos neuronales de los DRGs. Está presente además en la sustancia gris de la médula espinal.

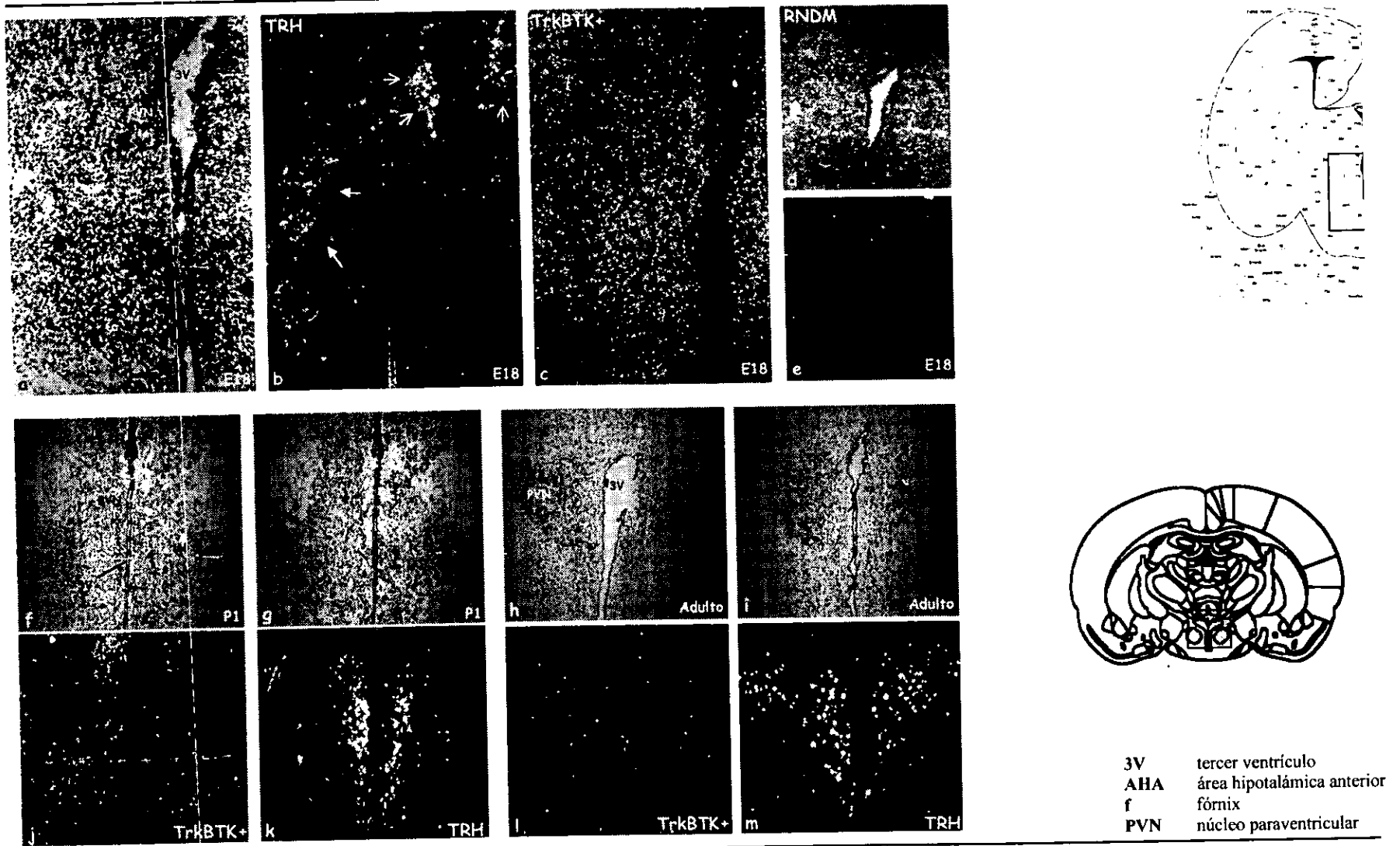
DH cuerno dorsal de la médula espinal  
 DRG ganglio de la raíz dorsal  
 ne neuroepitelio  
 VH cuerno ventral de la médula espinal  
 vc comisura ventral de la médula espinal



**FIGURA 13.** Hibridación *in situ* con el oligo RNDM. (a, b) es un corte coronal adyacente a (c, d) a nivel del ganglio del V par craneal (flechas en a y b) de embrión (E16) en campo claro (a, c) y oscuro (b, d) (100x). El oligo RNDM (b) no produce ninguna señal, y sólo se observa un poco de ruido de fondo, mientras que con el oligo  $TrkB^{TK+}$  (d) se obtiene un patrón característico en el ganglio del V par craneal, en el que sólo algunos subgrupos celulares son positivos.  
 3V tercer ventrículo



**FIGURA 14.** Expresión del mRNA de TRH (**b, g**) y de  $TrkB^{TK+}$  (**c, h**) en E14 (**b, c**) y E16 (**g, h**). Los cortes coronales en campo claro que se muestran en la primera columna (**a, f**) y sus correspondientes imágenes en campo oscuro (**b, g**, respectivamente) son adyacentes a los cortes de la tercera columna (**c, h**), y son representativos de lo que ocurre en esta región hipotalámica. En todos los casos el aumento es 50x. En la cuarta columna se muestran las ISHs realizadas con el oligo RNDM en E14 (**d, e**) y E16 (**i, j**). Las flechas en (**b**) y (**g**) señalan las células TRHérgicas del hipotálamo lateral. En (**c**) y (**h**) las flechas muestran el área hipotalámica. Nótese al patrón de hibridación del mRNA de  $TrkB^{TK+}$  en el ganglio del V par craneal ( $\odot$  en **h**). El área marcada ( $\odot$ ) en (**f**) representa una solución de continuidad en el tejido producto de la manipulación experimental. Para referencia se incluyen esquemas (obtenidos de Paxinos et al 1994) donde se indica el sitio aproximado al que corresponde cada corte.



**FIGURA 15.** Expresión del mRNA de TRH (b, k, m) y de TrkB<sup>TK+</sup> (c, j, l) en E18 (b, c) (100x), neonatos (P1) (j, k) (50x) y adultos (l, m) (50x). Se muestran cortes coronales representativos en campo claro (a, g, i) y oscuro (b, k, m) hibridados con el oligo TRH, los cuales son contiguos a los cortes hibridados con el oligo TrkB<sup>TK+</sup> (c, j, l, respectivamente). En (b), las flechas muestran la expresión del mRNA de TRH en el hipotálamo lateral, y las puntas de flecha al mRNA de TRH en el PVN, y esta misma zona hibridada con el oligo RNDM se muestra en (d, e). Esquemas obtenidos de Paxinos et al 1994 y de Paxinos y Watson 1984.

En E16 se observa este mismo grupo de células positivas en el LH. El conjunto adopta ahora una forma alargada (Fig 14g), extendiéndose en sentido más lateral que en E14. La expresión del mRNA de TRH es también abundante. Nótese la ausencia de células positivas en la región que corresponde al PVN, lo cual es contrario a lo descrito por Burgunder y Taylor (1989), quienes detectan al mensajero de TRH por primera vez en este núcleo a esta edad gestacional.

En el día E18 el mRNA de TRH en el hipotálamo se expresa tanto en el PVN como en el LH (Fig 15b). Las células positivas del PVN se agrupan muy cerca de la dilatación con forma de diamante del tercer ventrículo, y casi no se extienden en sentido lateral, como ocurre en los adultos (Fig 15m). Las células positivas del LH, en cambio, se ven ahora más disgregadas y apartadas del tercer ventrículo, en una distribución similar a la del adulto (no se muestra).

Las células que expresan el mRNA de TRH en el PVN del neonato (Fig 15k) están distribuidas con un patrón muy similar al del adulto (Fig 15m), concentrándose la mayoría de éstas en la zona periventricular del núcleo, y extendiéndose algunas en dirección lateral.

En las cuatro edades evaluadas, la expresión del mRNA de TRH está conservada en sentido antero-posterior de modo análogo al que se observa en las figuras.

### **El mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> se expresa abundantemente a lo largo del hipotálamo**

Las hibridaciones con el oligo TrkB<sup>TK+</sup> demuestran una expresión abundante del mensajero en el día E14 en prácticamente toda la región hipotalámica (Fig 14c), incluyendo la zona que da origen al PVN, con excepción de las áreas neuroepiteliales. Este patrón de distribución se conserva en el hipotálamo en todas las edades evaluadas, aunque entre E14 y E16 parece haber un incremento en la expresión del mensajero (Fig 14c vs 13h)<sup>5</sup>, y coincide con el área del PVN que expresa el mRNA de TRH (Figs 13 y 14).

El hipotálamo de los neonatos también tiene un gran número de células TrkB<sup>TK+</sup> positivas, y es muy clara la expresión de este mensajero en el PVN (Fig 15j).

Una característica notable de la expresión del mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> en las zonas y edades evaluadas es que, cualitativamente, da la impresión de que prácticamente todas las células son positivas y se distribuyen homogéneamente (Figs 13c, 13h y 14c); sin embargo los niveles de expresión en términos de contenido de granos por célula son bajos, especialmente si se les compara con los niveles de expresión del mRNA de TRH (aunque hay que recordar que las ISHs en este último caso se hicieron utilizando dos oligos simultáneamente).

---

<sup>5</sup> Claramente este efecto puede presentarse también simplemente si incrementara la densidad celular en la zona, sin necesidad de que se incremente la expresión por célula del mensajero.



## Discusión

---

Hay diversos ejemplos de la participación de las neurotrofinas en procesos de diferenciación neuronal tanto en el sistema nervioso central como en el periférico (Huang y Reichardt 2001). El papel de la neurotrofina BDNF en tales procesos es de especial interés por su influencia en la adquisición del fenotipo neuropeptidérgico en algunos grupos neuronales, tales como el SRHérgico en ciertas neuronas hipotalámicas (Rage et al 1999, Loudes et al 2000) y neocorticales (Nawa et al 1993), o el fenotipo NPY en neocorteza, hipocampo y tálamo (Nawa et al 1994). En particular, nuestro grupo previamente demostró que en cultivos primarios de hipotálamo fetal BDNF incrementa la expresión del mRNA del neuropéptido TRH, pero únicamente en aquéllas neuronas que expresan también al mRNA de la isoforma catalítica del receptor a BDNF, TrkB<sup>TK+</sup> (Guerra-Crespo et al, en prensa). En estos cultivos, alrededor del 2% de las células expresan el mRNA de TRH, y de éstas el 48% expresa el de TrkB<sup>TK+</sup> (Guerra-Crespo et al, en prensa). Sin embargo, en el hipotálamo coexisten neuronas TRHérgicas con funciones muy diferentes, y el TRH puede, según sea al caso, actuar como neurotransmisor, como neuromodulador, o como hormona neurohipofisiotrópica. El grupo de neuronas TRHérgicas que conforman este último grupo están distribuidas en la región parvocelular del PVN (Lechan y Toni 1992, Strand 1999), y resulta obvio que no es posible distinguir en los cultivos a este subgrupo del resto fenotípicamente equivalente pero funcionalmente distinto. De aquí resulta la necesidad de estudiar la expresión del receptor TrkB<sup>TK+</sup> *in vivo* en el PVN, para definir si en efecto son las neuronas TRHérgicas de este núcleo las que expresan al receptor también y tuvieran por lo tanto el potencial de ser influidas por BDNF. Por otro lado, los mRNAs de TrkB y de BDNF y sus correspondientes productos están presentes en el PVN de ratas adultas (Merlio et al 1992, Castren et al 1995, Conner et al 1997, Kernie et al 2000), pero no está bien definido su patrón de expresión durante el desarrollo de este núcleo.

En el presente proyecto intentamos inicialmente relacionar la expresión del mRNA de TRH con el de TrkB<sup>TK+</sup> utilizando ISH fluorescente, con el fin de poder explicar la presencia de los mensajeros en términos de colocalización a nivel celular, con lo cual la relación entre ambos sería mucho más clara. La presencia de autofluorescencia en el tejido cerebral impidió obtener resultados a partir de los protocolos de ISH fluorescente. En diferentes esfuerzos por eliminar el problema tratamos los tejidos con proteasas, detergentes y/o agentes de bloqueo, sin resultado alguno. No es posible explicar el origen de tal autofluorescencia, aunque la presencia de aminos podría contribuir al fenómeno. Es interesante recalcar que no ha sido reportado un problema de autofluorescencia similar a éste en cerebros. Esta ausencia de reportes y la presencia de la autofluorescencia en los tejidos aún antes de someterles a cualquier tratamiento podría sugerir que el problema es consecuencia de alguna variación en las ratas que nosotros utilizamos.

Como alternativa elegimos realizar ISH radioactiva en cortes cerebrales adyacentes, alternando hibridaciones con el oligo TrkB<sup>TK+</sup>, los oligos TRH, o el control (oligo RNDM). La ISH isotópica ofrece una sensibilidad más alta que las técnicas que hacen uso de reacciones enzimáticas para precipitar algún colorante en las células (Kadkol et al 1999), lo cual es una ventaja si se asume que en general los niveles de expresión de los mRNAs durante el desarrollo serán bajos, al menos al principio de dicha expresión. La desventaja evidente de este método es la imposibilidad para colocalizar a los mensajeros a nivel celular.

Demostremos la especificidad de los oligos utilizados para identificar al mRNA de TRH mediante la comparación de los patrones de distribución de este mensajero reportados previamente por nuestro grupo (Sánchez et al 1997) y por otros grupos (p ej Lechan y Toni 1992) con los observados durante el desarrollo de este proyecto. Con el oligo que identifica al mRNA de TrkB<sup>TK+</sup>, la especificidad quedó demostrada también gracias al patrón de hibridación característico que se observa a lo largo del cerebro del adulto, y en los DRGs y los ganglios del V par desde etapas embrionarias (Klein et al 1990a,b, Kokaia et al 1993). La comparación entre sí de los patrones de hibridación generados con dos oligos diferentes, ambos dirigidos contra el mRNA de la isoforma catalítica de TrkB, contribuyen a corroborar la especificidad. La especificidad de todos los oligos utilizados se ve además apoyada por las alineaciones *in silico* realizadas entre las secuencias de nuestros oligos contra una extensa base de datos genómica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Finalmente, el diseño de un oligo de características similares a los de TRH y TrkB en cuanto a longitud y contenido de GCs, pero que no reconoce secuencia alguna (oligo RNDM), es un control negativo adecuado puesto que solamente se observa un discreto ruido de fondo distribuido homogéneamente en las ISHs realizadas bajo idénticas condiciones que las ISHs experimentales.

Puesto que en el PVN de la rata se expresa por primera vez el mRNA de TRH en E16 (Burgunder y Taylor 1989), y se detecta proTRH a partir del día E17 (Fig 8) (Okamura et al 1991), decidimos explorar la expresión de TrkB<sup>TK+</sup> en este núcleo a partir de E14, y luego en los días E16 y E18, y comparar los resultados con neonatos (P1), en los que tanto la morfología del PVN (Hyypä 1969) como la distribución hipotalámica del mRNA de TRH (Burgunder y Taylor 1989) corresponde a la observada en adultos. Claramente, el rango de estudio elegido cubre el periodo durante el cual deberían de actuar los factores determinantes del fenotipo TRHérgico.

Las hibridaciones radioactivas muestran que en efecto el mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> ya está presente desde el día E14 en el hipotálamo, incluyendo la región que da origen al PVN, y esta expresión se mantiene en E16, E18 y P1 en dicho núcleo en desarrollo. Al mRNA de TRH del PVN, en cambio, lo detectamos claramente en E18, pero no en E16, que es el primer día en el que se describe en un reporte previo (Burgunder y Taylor 1989). Esta discrepancia puede explicarse si consideramos que en nuestro laboratorio la rata hembra se pone en contacto con la rata macho a lo largo de 18 horas. No es posible por lo tanto determinar el momento en el que ocurre la fecundación, y en cambio el rango es lo suficientemente amplio como para permitir un margen de error de hasta un día en el establecimiento de la edad gestacional. En el

mencionado reporte de Burgunder y Taylor (1989) son escasas las células TRHérgicas que se localizan en el PVN en E16. Nosotros por el contrario, observamos en E18 un número razonable de células TRHérgicas y una conformación del PVN tal que sugiere la posibilidad de que nuestros embriones estuvieran expresando el mRNA de TRH en tal núcleo desde E17. En cualquier caso, esta discrepancia no interfiere con nuestros objetivos, ni es necesariamente contraria a reportes previos en donde no se detecta proTRH en el PVN antes de E17 (Okamura et al 1991). Por lo tanto, en cuanto al objetivo inicial, nuestros datos sugieren claramente una relación espacio-temporal entre la aparición del mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> y las neuronas del PVN que expresan al mensajero de TRH. Esto es consistente con la hipótesis de que la expresión de la isoforma catalítica de TrkB es un requisito para la inducción del gen de TRH. Sin embargo, queda por definir si en el PVN se expresa el receptor TrkB catalítico antes de TRH, y si esta relación ocurre a nivel celular. Los estudios realizados a la fecha con ratones *TrkB*<sup>-/-</sup> o *Bdnf*<sup>-/-</sup> no describen lo que ocurre a nivel del hipotálamo. Analizar el hipotálamo de estos mutantes podría ayudar a confirmar la relación entre la expresión de TrkB<sup>TK+</sup> y la de TRH.

Las neuronas TRHérgicas del LH muestran también una relación espacial a nivel regional con la expresión del mRNA de TrkB<sup>TK+</sup>. Se requieren estudios a edades más tempranas para establecer la relación temporal que guardan aquéllas con el receptor. También se desconoce el patrón espacio-temporal de BDNF en el PVN durante el desarrollo. Es posible que BDNF se exprese en edades más tempranas que el mRNA de TRH, y entonces sería éste un elemento adicional que apoyaría la hipótesis, asumiendo la activación de TrkB<sup>TK+</sup> por esta neurotrofina. Sin embargo, BDNF podría expresarse tardíamente con relación a TRH, y la participación de TrkB<sup>TK+</sup> en la inducción de TRH ser independiente de su neurotrofina correspondiente. Al menos en neuronas del hipocampo, TrkB puede activarse indirectamente mediante el receptor de adenosina A<sub>2A</sub> sin necesidad de neurotrofinas (Lee y Chao 2001), y ejemplos análogos de activación indirecta de TrkB<sup>TK+</sup> podrían esperarse en el hipotálamo. Alternativamente, la expresión de BDNF podría tener lugar alrededor del día E15, y ésto ser una diferencia determinante entre la inducción del TRH en el LH y del TRH del PVN neuroendócrino. Es entonces importante definir mediante ISH e inmunocitoquímica la expresión de la proteína y el mRNA de BDNF en el PVN durante el desarrollo.

Cabe recalcar la ausencia del mRNA de TrkB<sup>TK+</sup> en el neuroepitelio del tercer ventrículo (Figs 13 c, h). Este es el sitio que dá origen a las células que conforman los núcleos del hipotálamo (Card et al 1999), y este hecho sugiere que TrkB<sup>TK+</sup> pudiera participar en los procesos de diferenciación terminal y no durante eventos tempranos del desarrollo tales como proliferación celular. De manera análoga, es interesante que en adultos se haya propuesto al epitelio endodermal como fuente de células troncales (Johansson et al 1999), y que en tal región en ratones adultos se exprese TrkB<sup>TK-</sup> pero no TrkB<sup>TK+</sup> (Klein et al 1990a). Un reporte reciente, sin embargo, muestra que la administración intraventricular de BDNF promueve la proliferación de precursores neuronales en el cerebro de rata adulta en el hipotálamo (y en particular en el PVN), y que tal proliferación está relacionada con sitios de elevada expresión de TrkB<sup>TK+</sup>, aún cuando las células proliferativas no son las que expresan al receptor (Pencea

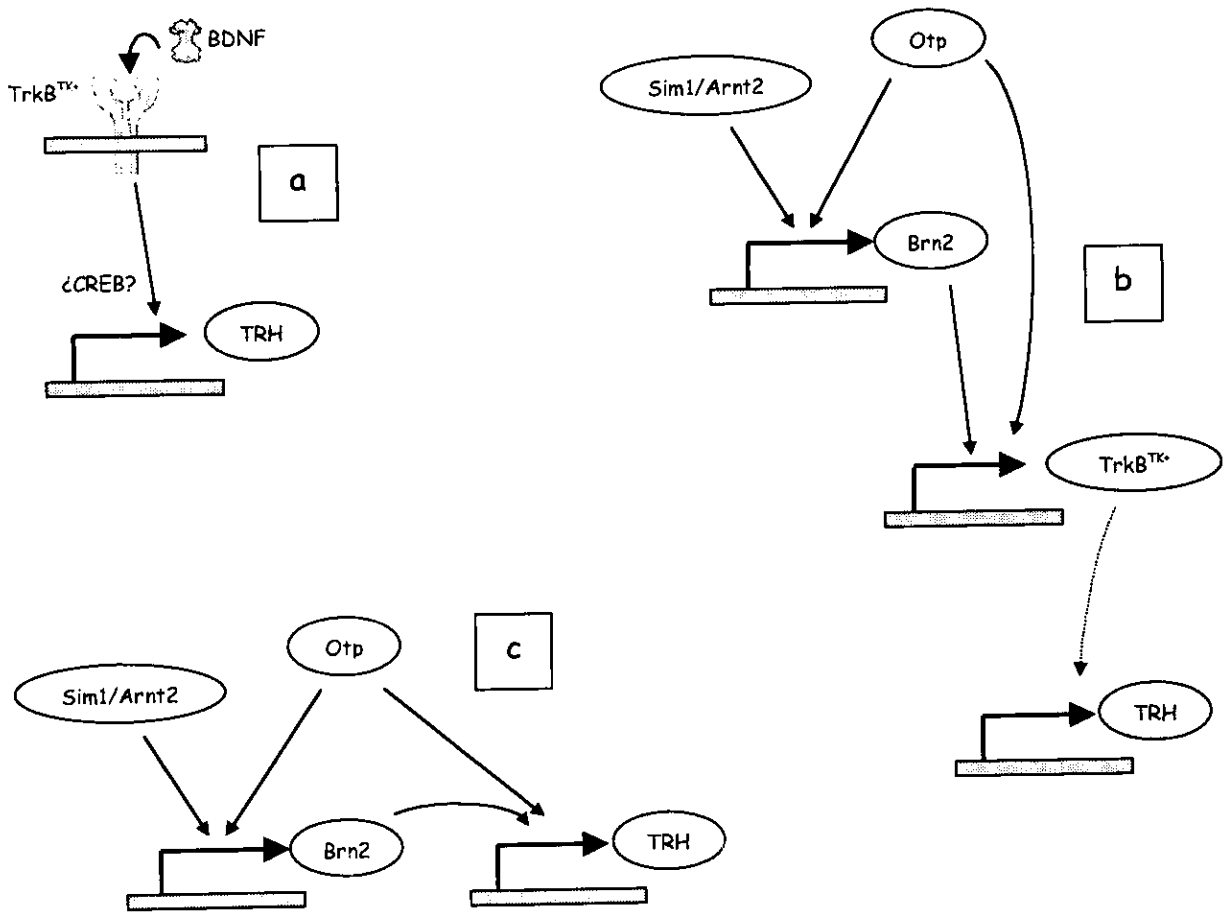
et al 2001). Así, la activación de  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  por BDNF podría participar en eventos de proliferación de precursores neuronales indirectamente, activando por ejemplo la producción a nivel local de factores tróficos, y de manera directa en eventos de diferenciación en neuronas que expresen al receptor. Alternativamente, la isoforma no catalítica de TrkB podría estar involucrada directamente en procesos de diferenciación neuronal, puesto que las isoformas TK- de TrkB probablemente activan cascadas de transducción de señales no definidas aún (Baxter et al 1997), además de que, como se mencionó, se expresan en zonas potencialmente proliferativas.  $\text{TrkB}^{\text{TK}^-}$  podría también funcionar como un elemento dominante negativo, manteniendo en estado potencialmente proliferativo a los precursores neuronales, y solamente permitiendo a éstos diferenciarse en el momento de cambiar la expresión del receptor a la isoforma catalítica.

En el caso de las células neurosecretorias TRHérgicas del PVN, los efectos de BDNF sobre el incremento *in vitro* en la expresión del mensajero de TRH (Guerra-Crespo et al, en prensa) sugieren una acción directa de la activación de  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  sobre la transcripción (Fig 16a). Esta idea está apoyada por el incremento en la cantidad de la proteína verde fluorescente que se observa tras agregar BDNF a células del hipotálamo fetal en cultivo transfectadas con el promotor de TRH acoplado a dicha proteína fluorescente (Guerra-Crespo, sin publicar). Como parte de este modelo simple cabe comentar que la región reguladora del gen de TRH posee dos sitios CRE (Lee et al 1988), y CREB es uno de los factores de transcripción activados por la unión de BDNF a  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  (Gaiddon et al 1996).

El mRNA de TrkB, sin embargo, se expresa en neuronas con fenotipos diferentes. Por ejemplo, el 27% de las células en cultivos fetales hipotalámicos expresan el mRNA de TrkB, y sólo el 2% del total de células en estos cultivos expresan al mRNA de TRH (Guerra-Crespo et al, en prensa). Es entonces obvia la necesidad de colaboración de otros factores para el establecimiento del fenotipo TRHérgico. Los factores de transcripción Otp, una homeoproteína, y Brn2, de la familia POU, son candidatos importantes, puesto que ambos se expresan en el PVN durante el desarrollo (Fig 7) (Simeone et al 1994, Michaud et al 1998), y en los mutantes homocigóticos de cualquiera de estas dos proteínas no hay TRH en el PVN (Nakai et al 1995, Acampora et al 1999, Wang y Lufkin 2000). La delección de cualquiera de los monómeros que conforman al heterodímero Sim1/Arnt2, de la familia de factores de transcripción bHLH-PAS, produce un fenotipo similar (Michaud et al 1998, Hosoya et al 2001), puesto que de este heterodímero depende la transcripción de *Brn2* (Michaud et al 1998). Además, delecciones en otro factor de transcripción POU, Brn3a, reducen la expresión de los receptores Trk (pero no de p75NTR) en los ganglios del trigémino durante el desarrollo (Huang et al 1999). Así, es posible imaginar que la colaboración entre la activación de  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$ , Otp y Brn2 es requerida para encender la transcripción del gen de TRH (Fig 16b). Alternativamente, los factores de transcripción Otp, Brn2 y Sim1/Arnt2 podrían contribuir al nacimiento de las neuronas TRHérgicas sin tener ninguna relación con el gen de TRH.

Por último, es claro que los factores de transcripción específicos de estas líneas neuroendócrinas podrían actuar con independencia de la actividad de  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  (Fig 16c). No se

sabe hasta el momento si *Otp* es capaz de activar directamente la transcripción del gen *trh*, pero un ejemplo cercano ocurre con la también hormona hipofisiotrópica GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas). La acción directa de la homeoproteína *Otx2* en el promotor de GnRH regula la expresión tejido-específica del gen de esta hormona en el hipotálamo de ratón adulto (Kelley et al 2000).



**FIGURA 16.** Modelos que ilustran las posibles relaciones entre  $TrkB^{TK+}$ , algunos factores transcripcionales, y la adquisición del fenotipo TRHérgico neuroendócrino en el PVN. En el modelo más simple (a), la activación de  $TrkB^{TK+}$  influye directamente sobre el promotor de *Trh*, induciendo la expresión de esta hormona. Por otro lado, los factores transcripcionales *Otp*, *Brn2* y/o *Sim1/Arnt2* podrían regular la expresión de *TrkB* (b), y éste a su vez participar en la adquisición del fenotipo TRHérgico mediante la activación de vías de transducción (línea punteada). En (c) se ilustra la participación de los factores de transcripción sobre el gen de *Trh* con independencia de *TrkB*.

Las consideraciones hechas en los párrafos anteriores se han orientado a los mecanismos que pudieran influenciar la expresión del mRNA de TRH. Sin embargo, hay que recordar que para manifestarse un fenotipo peptidérgico determinado se requiere también de otros mecanismos, tales como traducción, transporte a través de la vía secretoria, procesamiento del propéptido y exocitosis, adicionalmente a la mencionada transcripción, los cuales podrían estar sujetos a sistemas de control independientes. En cultivos primarios de hipotálamo fetal suplementados con suero, por ejemplo, el mRNA de TRH incrementa

espontánea y progresivamente desde el inicio del cultivo, pero los niveles de TRH solamente se elevan a partir de la segunda semana (Pérez-Martínez et al, en prensa), y, como se mencionó antes, adicionar BDNF a las neuronas hipotalámicas en cultivo incrementa en algunas la expresión del mRNA de TRH, pero no los niveles intracelulares del péptido (Guerra-Crespo et al, en prensa). Es de esperar por lo tanto la participación de una gran variedad de mecanismos capaces de influir sobre la adquisición del fenotipo peptidérgico.

En conclusión, el presente trabajo muestra que el mRNA de  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  se expresa en la región hipotalámica que dá origen al PVN antes de que se exprese el mRNA de TRH en dicho núcleo, lo cual apoya la idea de que la activación de la isoforma catalítica del receptor TrkB durante el desarrollo pudiera colaborar en la adquisición del fenotipo TRHérgico neuroendócrino. Para complementar esta información, queda por definir la ontogenia de BDNF y/o su mensajero en este núcleo hipotalámico a partir del día E14, y establecer si la expresión de TRH y  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  coinciden a nivel celular. También sería interesante evaluar la expresión de TRH en el PVN de ratones *TrkB*<sup>-/-</sup>, y la expresión del receptor  $\text{TrkB}^{\text{TK}^+}$  en el mismo núcleo de ratones *Otp*<sup>-/-</sup> durante el desarrollo, con el fin de establecer las posibles relaciones espacio-temporales existentes entre ellos y su participación en la definición fenotípica TRHérgica neuroendócrina.

## **Anexos**

---

### **1. Gelatinización de laminillas**

- Lavar brevemente las laminillas (Esco, Erie Scientific Company, no. cat. 2955) en etanol al 100%.
- Enjuagar en agua (MilliQ, Millipore).
- Secar en estufa a 180°C durante 3 horas.
- Sumergir las laminillas en la solución de gelatina (gelatina 0.65%, sulfato de cromo y potasio 0.05%) precalentada a 45°C durante 15 min.
- Dejar secar a temperatura ambiente.
- Hornear a 37°C durante 12 horas.

## 2. Secuencias de los oligonucleótidos usados

### TRH 317

5' GTCTTTTTCCTCCTCCTCCCTTTTGCCTGGATGCTGGCGTTTTGTGATCC 3'

50 mer

C+G: 52%

Tm<sup>6</sup>: 77°C

### TRH1245

5' ATGCGACCCCCACCCCAAGGACATATCTAAACATCTCCCAAAGTCTCA 3'

50 mer

G+C: 52%

Tm: 77°C

### RNDM

5' GCCCTCCAGTCCCTAATAGGGTAGTCCAGACTCTTCTAAGCCCCCTAAC 3'

50 mer

G+C: 56%

Tm: 79°C

### TRKB<sup>TK+</sup>

5' TACAACAAGGCATTGTTAGTTGTGGTGGGCAAAGTGGAGTGTCTGCTG 3'

48 mer

G+C: 48%

Tm: 76°C

### TRKB<sup>TK+/c</sup>

5' CCGGGACATCCCGAAGTCCCAATTTTCACCAGCAGGTTCTCTCCTACCA 3'

50 mer

G+C: 56%

Tm: 79°C

---

<sup>6</sup> Calculada de acuerdo con la fórmula:

$T_m = 67.5 + (0.34)(\%G+C) - 395/\text{longitud}$



### 3. Reactivos

REACTIVO	LABORATORIO	NO. CATÁLOGO
Acetato de sodio	J.T.Baker	3470
Ácido bórico, granular	J.T.Baker	0084-01
Acrilamida 99.9%	BioRad	161-0100
Albúmina sérica bovina (BSA) fracción V	Sigma	A 7906
Anhídrido acético, min. 98%	Sigma	A 6404
APS (persulfato de amonio)	BioRad	161-0700
Citrato de sodio, dihidrato, granular, min 99%	J.T.Baker	3646
Cloroformo, min 98%	J.T.Baker	9186
Cloruro de sodio, cristal	J.T.Baker	3624
Dextrán sulfato	Pharmacia	17-0340-01
DNA de esperma de salmón, sal sódica	Sigma	D 1626
EDTA, sal disódica, dihidratada	Sigma	E 5134
Etanol anhidro	J.T.Baker	9000
Ficoll, tipo 400-DL	Sigma	F 9378
Fijador GBX	Kodak	190 1875
Formamida	Sigma	F 7503
Fosfato de potasio monobásico, cristalino, min 99%	J.T.Baker	3246
Fosfato de sodio dibásico, anhidro, min 99%	J.T.Baker	3828
Fosfato de sodio monobásico	J.T.Baker	3818
Gelatina	Sigma	G 2625
HCl, 36.5-38%	J.T.Baker	9535
KCl	Sigma	P 4504
NaOH, lentejas, min 98%	J.T.Baker	3722
Paraformaldehído, cristalino	Sigma	P 6148
Polivinil pirrolidona (PVP)	Sigma	P 5288
Resina AG 501-X8(D)	BioRad	142-6425
Revelador D19	Kodak	146 4593
SDS	BioRad	161-0301
TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen etilendiamina)	BioRad	161-0801
Trietanolamina base, min 98%	Sigma	T 1377
Tris base (Trizma), min 99.9%	Sigma	T 8524
tRNA de levadura, tipo X-SA	Sigma	R 8759
Urea	Merck	12007
Xilol	J.T.Baker	9490

#### 4. Soluciones<sup>7</sup>

##### **Buffer de fosfatos, 1 M**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	6.9 g / 50 ml	(1 M)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	7.1 g / 50 ml	(1 M)

- Preparar cada solución por separado.
- Mezclar hasta lograr pH 7.4.
- Filtrar y autoclavar.
- Almacenar a 4°C.

##### **Buffer TE, pH 8.0**

- Tris-HCl, lo suficiente para una concentración final de 10 mM.
- EDTA, lo necesario para lograr 1 mM de concentración final.
- Si es necesario, se ajusta el pH con HCl.
- Almacenar a temperatura ambiente.

##### **Denhardt's 100x**

Ficoll	1 g
PVP	1 g
BSA	1 g
Agua	

- Aforar a 50 ml en tubo de plástico de centrifuga y mezclar en agitador horizontal.
- Filtrar.
- Hacer alícuotas pequeñas (0.5 ó 1.0 ml) en tubos Eppendorf y almacenar a -20 °C.
- Es posible reutilizar las alícuotas tras descongelamiento.

##### **DNA de esperma de salmón**

- Mezclar en tubo de plástico la cantidad necesaria para lograr una concentración final de 10 mg/ml. (preparar 10 a 20 ml).
- Sonicar dando varios pulsos de 1 min, hasta que la solución se vuelva más líquida.
- Alternar los pulsos con el reposo en hielo, para evitar que se caliente la solución.
- Hacer alícuotas de 1 ml y almacenar a -20 °C.

<sup>7</sup> Ver Sambrook et al 1989

### **EDTA 0.5 M, pH 8.0**

EDTA disódico 9.505 g

Agua

- Mezclar, e ir agregando poco a poco lentejas de NaOH (ayuda a disolver EDTA).
- Ajustar pH a 8.0 con NaOH.
- Aforar a 50 ml.
- Filtrar (0.22  $\mu\text{m}$ ) y autoclavar (120 °C, 20 psi, 30 min).
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **Formamida deionizada 100%**

Formamida 50 ml

Resina BioRad 501-X8(D) 5 g

- Mezclar a temperatura ambiente (agitador magnético) durante 10-15 min.
- Filtrar.
- En caso de que toda la resina se haya tornado amarilla, entonces repetir la operación.
- Hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.
- Pueden ser reutilizadas las alícuotas.

### **Mezcla de hibridación**

Formamida deionizada + 20% dextrán sulfato	2.5 ml	(50% / 10%)
SSC 20x	1 ml	(4x)
Buffer de fosfatos + 10% sarcosyl	500 $\mu\text{l}$	
Denhardt's 100x	50 $\mu\text{l}$	(1x)
DNA de salmón, 10 mg/ml	125 $\mu\text{l}$	(250 $\mu\text{g/ml}$ )
tRNA, 10 mg/ml	125 $\mu\text{l}$	(250 $\mu\text{g/ml}$ )
DTT	240 $\mu\text{l}$	
poliA, 10 mg/ml	125 $\mu\text{l}$	(250 $\mu\text{g/ml}$ )
Agua	75 $\mu\text{l}$	
Total	5 ml	

- Disolver el dextrán sulfato en agua y mezclar en agitador horizontal.
- Agregar el resto de los reactivos.
- Dejar reposar la mezcla durante 12 hrs a -20 °C.
- Almacenar a -20 °C.

### **Paraformaldehído 4%**

Paraformaldehído	2.8 g	16 g
PBS 10x	7 ml	40 ml
Aforar a	70 ml	400 ml

- El paraformaldehído es tóxico. Deberá utilizarse máscara al pesarlo. Disolverlo en campana de extracción.
- Prepararlo justo antes de ser utilizado.
- Calentar agua a no más de 65 °C.
- Agregar PBS (suficiente para lograr concentración final de 1x) y el paraformaldehído.
- Agitar (agitador magnético).
- Esperar hasta que esté completamente transparente y a temperatura ambiente; luego filtrar (0.22 µm).

### **PBS 10x, pH7.0**

NaCl	80 g	(1.36 M)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g	(14.7 mM)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	11.44 g	(80 mM)
KCl	2 g	(26.8 mM)
Agua		

- Mezclar y aforar a 1 lt.
- Filtrar (0.22 µm) y autoclavar (120 °C, 20 psi, 30 min).
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **SDS 10%**

SDS	5 g
Agua	50 ml

- Agitar (agitador horizontal).
- Almacenar a TA.
- No se esteriliza.

### **Solución de acetilación, pH 8.0**

SSC 20x	14 ml	80 ml	(4x)
Trictanolamina	1040 ml	5.9 ml	(0.1 M)
Anhídrido acético	175 µl	1 ml	(0.25%)
Aforar a	70 ml	400 ml	

- Preparar al momento. El anhídrido deberá agregarse justo antes de ser utilizada la solución.

- Ajustar el pH a 8.0 con HCl.

### **SSC 20x**

Cloruro de sodio	175.32 g	(3 M)
Citrato de sodio	88.23 g	(0.3 M)

- Ajustar pH a 7.0 con HCl.
- Aforar a 1 litro.
- Filtrar (0.22  $\mu$ m) y autoclavar (120 °C, 20 psi, 30 min).
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **TBE 5x**

Tris base	54 g
Ácido bórico	27.5 g
EDTA 0.5 M, pH 8.0	20 ml

- Aforar a 1 lt y filtrar.
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **Tris-HCl 1 M, pH 7.4**

Tris base	6.055 g
Agua	

- Mezclar Tris y agua, ajustando el pH a 7.4 con HCl.
- Aforar a 50 ml.
- Filtrar (0.22  $\mu$ m) y autoclavar (120°C, 20 psi, 20 minutos).
- Almacenar a temperatura ambiente.

### **tRNA de levadura**

- Disolver en agua el polvo liofilizado a temperatura ambiente hasta lograr una concentración de 10 mg/ml.
- Hacer alícuotas de 0.5 ó 1.0 ml, y almacenar a -20 °C.
- Pueden reutilizarse las alícuotas tras haber sido descongeladas.

## 5. Marcaje de oligodeoxinucleótidos con terminal deoxinucleotidil transferasa y <sup>35</sup>SdATP

oligonucleótido 2 pmol/μl	1 μl	(2 pmol)
buffer TdT 5x <sup>8,9</sup>	3 μl	(1x)
CoCl <sub>2</sub> 25 mM <sup>9</sup>	0.9 μl	(1.5 mM)
<sup>35</sup> SdATP		(20 μCi) <sup>10</sup>
TdT 25 U/μl	1.5 μl	(37.5 U)
agua	7 μl	
vol final	15 μl	

1. Mezclar el oligo con el agua y desnaturalizar a 65°C durante 10 min. Colocar en hielo después.
2. Agregar el resto de los componentes e incubar 30 min a 37°C.
3. Colocar en hielo y agregar 1 μl de EDTA 0.5 M.
4. Extraer 1 μl y agregarlo a 24 μl de solución de precipitación (10 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5 mg/ml tRNA):
  - de estos 25 μl, colocar 5 μl en papel DE81 (aprox 1 cm<sup>2</sup>) por cuadruplicado
  - secar en el horno
  - lavar dos de esos papeles:
    - 5 x 5 min en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 M (17.75 g en 250 ml agua)
    - 1 x 1 min en agua
    - 1 x 1 min en etanol 100%
    - secar en el horno
  - determinar CPMs de los papeles lavados y no lavados (ver Anexo 6)
5. Agregar a la muestra
  - 1 μl tRNA 10 mg/ml
  - 1.5 μl NaOAc 3 M pH 7.0
  - 35 μl etanol 100%
6. Precipitar a -70°C toda la noche.
7. Centrifugar a 15,000 rpm durante 30 min a 4°C.
8. Decantar, secar a TA, y resuspender en 45 μl de TE + 5 μl DTT.
9. Colocar 1 μl en papel DE81 por duplicado y medir CPMs

<sup>8</sup> Buffer 5x: 1 M cacodilato de potasio, 125 mM Tris-HCl, 1.25 mg/ml BSA, pH 6.6 a 25 °C.

<sup>9</sup> Incluidos en el kit de Terminal Transferasa (Boehringer Mannheim).

<sup>10</sup> El volumen dependerá de la actividad específica final (SA<sub>f</sub>) del isótopo al momento de utilizarlo. La actividad específica final para el <sup>35</sup>S puede calcularse de acuerdo con la fórmula:  $SA_f = f / \{ (1/SA_0) - ([1-f]/1494) \}$  en donde SA<sub>0</sub> es la actividad específica a la fecha de calibración (1250 Ci/mmol, con 12.5 mCi/ml, para el caso del <sup>35</sup>S que utilizamos), y f es el factor de decaimiento al día de ser utilizado el isótopo, que puede obtenerse a partir de tablas proporcionadas por el distribuidor.

## 6. Cálculo de la actividad específica de los oligonucleótidos

Cada uno de los papeles DE81 con que se cuenta (ver paso no. 5 del protocolo de marcaje de oligonucleótidos, Anexo 5) se coloca en un vial con líquido de centelleo y se miden las CPMs en el contador beta. El valor promedio de las CPMs de los papeles lavados dividido entre el valor promedio de las CPMs de los papeles sin lavar, multiplicado por cien, es igual al porcentaje de incorporación de la marca radioactiva.

El promedio de los valores de las CPMs medidas de un muestra de 1  $\mu$ l del oligo obtenido por duplicado al final del procedimiento de marcaje (ver punto no. 9, Anexo 5), dividido entre el total de DNA colocado en dicho papel, es igual a la actividad específica de la sonda (CPMs/ $\mu$ g de DNA).

## Referencias

---

- Acampora D, Postiglione MP, Avantaggiato V, Bonito MD, Vaccarino FM, Michaud J, Simeone A (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev* **13**:2787-2800
- Altman J, Bayer SA (1978a). Development of the diencephalon in the rat. I. Autoradiographic study of the time of origin and settling patterns of neurons of the hypothalamus. *J Comp Neurol* **182**:945-972
- Altman J, Bayer SA (1978b). Development of the diencephalon in the rat. II. Correlation of the embryonic development of the hypothalamus with the time of origin of its neurons. *J Comp Neurol* **182**:973-994
- Anderson DJ, Jan YN (1998). The determination of the neuronal phenotype. En Cowan WM (ed): Molecular and cellular approaches to neural development. Oxford University Press, Oxford.
- Armstrong WE (1985). Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. En Paxinos G (ed): The rat nervous system, vol 1: Forebrain and midbrain. Academic Press, Sydney.
- Atwal JK, Massie B, Miller FD, Kaplan DR (2000). The TrkB-Shc site signals neuronal survival and local axon growth via MEK and PI3-kinase. *Neuron* **27**:265-277
- Barbacid M (1995). Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann NY Acad Sci* **766**:442-458
- Baxter GT, Radeke MJ, Kuo RC, Makrides V, Hinkle B, Hoang R, Medina-Selby A, Coit D, Valenzuela P, Feinstein SC (1997). Signal transduction mediated by the truncated trkB receptor isoforms, trkB.T1 and trkB.T2. *J Neurosci* **17**:2683-2690
- Bibel M, Hoppe E, Barde Y-A (1999). Biochemical and functional interactions between the neurotrophin receptors trk and p75NTR. *EMBO J* **18**:616-622
- Burbach JPH (2000). Genetic pathways in the developmental specification of hypothalamic neuropeptide and midbrain catecholamine systems. *Eur J Pharmacol* **405**:55-62
- Burgunder J-M, Taylor T (1989). Ontogeny of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the rat diencephalon. *Neuroendocrinology* **49**:631-640
- Card JP, Swanson LW, Moore RY (1999). The hypothalamus: an overview of regulatory systems. En Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds): Fundamental neuroscience. Academic Press, San Diego.
- Casaccia-Bonnel P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV (1996). Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**:716-719
- Castren E, Thoenen H, Lindholm D (1995). Brain-derived neurotrophic factor messenger RNA is expressed in the septum, hypothalamus and in adrenergic brain stem nuclei of adult rat brain and is increased by osmotic stimulation in the paraventricular nucleus. *Neuroscience* **64**:71-80
- Chao M, Casaccia-Bonnel P, Carter B, Chittka A, Kong H, Yoon SO (1998). Neurotrophin receptors: mediators of life and death. *Brain Res Rev* **26**:295-301
- Chao MV (1992). Neurotrophin receptors: a window into neuronal differentiation. *Neuron* **9**:583-593
- Conner JM, Lauterborn JC, Yan Q, Gall CM, Varon S (1997). Distribution of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and mRNA in the normal



adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport. *J Neurosci* **17**:2295-2313

Cowan WM (2001). Viktor Hamburger and Rita Levi-Montalcini: The path to the discovery of nerve growth factor. *Annu Rev Neurosci* **24**:551-600

Dechant G, Barde Y-A (1997). Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol* **7**:413-418

Fariñas I, Reichardt LF (1996). Neurotrophic factors and their receptors: implications of genetic studies. *Sem Neurosci* **8**:133-143

Figdor MC, Stern CD (1993). Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* **363**:630-634

Frade JM, Barde Y-A (1998). Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *BioEssays* **20**:137-145

Frade JM, Rodríguez-Tébar A, Barde Y-A (1996). Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* **383**:166-168

Friedman WJ, Black IB, Kaplan DR (1998). Distribution of the neurotrophins brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3, and neurotrophin-4/5 in the postnatal rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* **84**:101-114

Fujioka T, Sakata Y, Yamaguchi K, Shibasaki T, Kato H, Nakamura S (1999). The effects of prenatal stress on the development of hypothalamic paraventricular neurons in fetal rats. *Neuroscience* **92**:1079-1088

Gaiddon C, Loeffler JP, Larmet Y (1996). Brain-derived neurotrophic factor stimulates AP-1 and cyclic AMP-responsive element dependent transcriptional activity in central nervous system neurons. *J Neurochem* **66**:2279-2286

Gibbs RB, Pfaff DW (1994). *In situ* hybridization detection of trkA mRNA in brain: distribution,

colocalization with p75NGFR and up-regulation by nerve growth factor. *J Comp Neurol* **341**:324-329

Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl, Thoenen H (1994). Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature* **372**:266-269

Guerra-Crespo M, Ubieta R, Joseph-Bravo P, Charli J-L, Pérez-Martínez L (2001). BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci*, en prensa

Hallböök F (1999). Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families. *Curr Opin Neurobiol* **9**:616-621

Harris WA, Hartenstein V (1999). Cellular determination. En Zigmund MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds): *Fundamental neuroscience*. Academic Press, San Diego.

Hassink GC, Van Esseveldt KE, Dijkhuizen PA, Verhaagen J, Boer GJ (1999). Ontogeny of neurotrophin receptor TrkC expression in the rat forebrain and anterior hypothalamus with emphasis on the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **92**:705-712

Heppenstall PA, Lewin GR (2001). BDNF but not NT-4 is required for normal flexion reflex plasticity and function. *Proc Natl Acad Sci* **98**:8107-8112

Holder JL, Butte NF, Zinn AR (2000). Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* **9**:101-108

Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen C-K, Valletta JS, Zhou J, Long JB, Mobley WC (1992). p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* **9**:465-478

Hosoya T, Oda Y, Takahashi S, Morita M, Kawachi S, Ema M, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y (2001). Defective development of

secretory neurones in the hypothalamus of Arnt2-knockout mice. *Genes Cells* 6:361-374

Huang EJ, Reichardt LF (2001). Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24:677-736

Huang EJ, Zang K, Schmidt A, Saulys A, Mengqing X, Reichardt LF (1999). POU domain factor Brn-3a controls the differentiation and survival of trigeminal neurons by regulating Trk receptor expression. *Development* 126:2869-2882

Hubbard SR (1999). Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol* 71:343-358

Hyypä M (1969). Differentiation of the hypothalamic nuclei during ontogenetic development in the rat. *Z Anat Entwickl-Gesch* 129:41-52

Ibáñez CF (1998). Emerging themes in structural biology of neurotrophic factors. *Trends Neurosci* 21:438-444

Ifft JD (1972). An autoradiographic study of the time of final division of neurons in rat hypothalamic nuclei. *J Comp Neurol* 144:193-204

Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J (1999). Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 96:25-34

Johnson JE (1999). Neurotrophic factors. En Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds): *Fundamental neuroscience*. Academic Press, San Diego.

Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Pérez-Martínez L, Zoeller T, Charli JL (1998). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol* 18:231-247

Kadkol SS, Gage WR, Pasternack GR (1999). *In situ* hybridization-theory and practice. *Mol Diagn* 4:169-183

Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A (1999). Neurotrophin-evoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401:918-921

Kaplan DR, Miller FD (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 10:381-391

Kelley CG, Lavorgna G, Clark ME, Boncinelli E, Mellon PL (2000). The Otx2 homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter. *Mol Endocrinol* 14:1246-1256

Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000). BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *EMBO J* 19:1290-1300

Kintner C, Lumsden A (1999). Neural induction and pattern formation. En Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR (Eds): *Fundamental neuroscience*. Academic Press, San Diego.

Klein R, Conway D, Parada LF, Barbacid M (1990a). The trkB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61:647-656

Klein R, Martín-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (1990b). Expression of the tyrosine kinase receptor gene trkB is confined to the murine embryonic and adult nervous system. *Development* 109:845-850

Kojima S, Nakayama T, Kuwajima G, Suzuki H, Sakata T (1999). TrkB mutant lacking the amino-terminal half of the extracellular portion acts as a functional brain-derived neurotrophic factor receptor. *Biochim Biophys Acta* 1420:104-110

Kokaia Z, Bengzon J, Metsis M, Kokaia M, Persson H, Lindvall O (1993). Coexpression of neurotrophins and their receptors in neurons of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci* 90:6711-6715

- Lai K-O, Fu W-Y, Ip FCF, Ip NY (1998). Cloning and expression of a novel neurotrophin, NT-7, from carp. *Mol Cell Neurosci* 11:64-76
- Lamballe F, Smeyne RJ, Barbacid M (1994). Developmental expression of trkC, the neurotrophin-3 receptor, in the mammalian nervous system. *J Neurosci* 14:14-28
- Lechan RM, Toni R (1992). Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system. En Nemeroff CB (ed): Neuroendocrinology. CRC Press, Boca Raton.
- Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 231:159-161
- Lee FS, Chao MV (2001). Activation of trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci* 98:3555-3560
- Lee FS, Kim AH, Khursigara G, Chao MV (2001). The uniqueness of being a neurotrophin receptor. *Curr Opin Neurobiol* 11:281-286
- Lee SL, Stewart K, Goodman RH (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem* 263:16604-16609
- Liepinsh E, Ilag LL, Otting G, Ibáñez CF (1997). NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor. *EMBO J* 16:4999-5005
- Lo DC (1995). Neurotrophic factors and synaptic plasticity. *Neuron* 15:979-981
- Loudes C, Petit F, Kordon C, Faivre-Bauman A (2000). Brain-derived neurotrophic factor but not neurotrophin-3 enhances differentiation of somatostatin neurons in hypothalamic cultures. *Neuroendocrinology* 72:144-153
- Loudes C, Petit F, Kordon C, Faivre-Bauman A (1999). Distinct populations of hypothalamic dopaminergic neurons exhibit differential responses to brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and neurotrophin-3 (NT3). *Eur J Neurosci* 11:617-624
- Luehrsen KR, Davidson S, Lee YJ, Rouhani R, Soleimani A, Raich T, Cain CA, Collarini EJ, Yamanishi DT, Pearson J, Magee K, Madlansacay MR, Bodepudi V, Davoudzadeh D, Schueler PA, Mahoney W (2000). High-density hapten labelling and HRP conjugation of oligonucleotides for use as *in situ* hybridization probes to detect mRNA targets in cells and tissues. *J Histochem Cytochem* 48:133-145
- Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM, Yancopoulos GD (1990). NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron* 5:501-509
- Markakis EA, Swanson LW (1997). Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvocellular neuroendocrine system. *Brain Res Rev* 24:255-291
- Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada LF (1990). Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev* 4:683-694
- Meldolesi J, Sciorati C, Clementi E (2000). The p75 receptor: first insights into the transduction mechanisms leading to either cell death or survival. *Trends Pharmacol Sci* 21:242-243
- Merlio J-P, Ernfors P, Jaber M, Persson H (1992). Molecular cloning of rat trkC and distribution of cells expressing messenger RNAs for members of the trk family in the rat central nervous system. *Neuroscience* 51:513-532
- Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Lévy E, Mitchell GA, Hinum-Hagen J, Fan C-M (2001). Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 10:1465-1473

- substrates of Trk receptors in developing neurons. *Neuron* **21**:1017-1029
- Rage F, Riteau B, Alonso G, Tapia-Arancibia L (1999). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 enhance somatostatin gene expression through a likely direct effect on hypothalamic somatostatin neurons. *Endocrinology* **140**:909-916
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sánchez E, Charli J-L, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P, Uribe RM (1997). Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res* **761**:77-86
- Schonemann MD, Ryan AK, McEvelly RJ, O'Connell SM, Arias CA, Kalla KA, Li P, Sawchenko PE, Rosenfeld MG (1995). Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev* **9**:3122-3135
- Schuman EM (1999). Neurotrophin regulation of synaptic transmission. *Curr Opin Neurobiol* **9**:105-109
- Shioda S, Nakai Y (1983). Ontogenetic development of TRH-like immunoreactive nerve terminals in the median eminence of the rat. *Anat Embryol* **167**:371-378
- Simeone A, D'Apice MR, Nigro V, Graziani F, Acampora D, Avantsaggiato V (1994). Orthopedia, a novel homeobox-containing gene expressed in the developing CNS of both mouse and drosophila. *Neuron* **13**:83-101
- Skaper SD, Walsh FS (1998). Neurotrophic molecules: strategies for designing effective therapeutic molecules in neurodegeneration. *Mol Cell Neurosci* **12**:179-193
- Snider WD (1994). Functions of the neurotrophins during nervous system development: what the knockouts are teaching us. *Cell* **77**:627-638
- Strand FL (1999). Neuropeptides: regulators of physiological processes. MIT Press, Cambridge.
- Taylor T, Gyves P, Burgunder JM (1990). Thyroid hormone regulation of TRH mRNA levels in rat paraventricular nucleus of the hypothalamus changes during ontogeny. *Neuroendocrinology* **52**:262-267
- Tessarollo L, Tsoulfas P, Martín-Zanca D, Gilbert DJ, Jenkins NA, Copeland NG, Parada LF (1993). trkC, a receptor for neurotrophin-3, is widely expressed in the developing nervous system and in non-neuronal tissues. *Development* **118**:463-475
- Timmusk T, Belluardo N, Metsis M, Persson H (1993). Widespread and developmentally regulated expression of neurotrophin-4 mRNA in rat brain and peripheral tissues. *Eur J Neurosci* **5**:605-613
- Ultsch MH, Wiesmann C, Simmons LC, Henrich J, Yang M, Reilly D, Bass SH, de Vos AM (1999). Crystal structures of the neurotrophin-binding domain of TrkA, TrkB and TrkC. *J Mol Biol* **290**:149-159
- Urfer R, Tsoulfas P, O'Connell L, Hongo J-A, Zhao W, Presta LG (1998). High resolution mapping of the binding site of TrkA for nerve growth factor and TrkC for neurotrophin-3 on the second immunoglobulin-like domain of the Trk receptors. *J Biol Chem* **10**:5829-5840
- van Kesteren RE, Fainzilber M, Hauser G, van Minnen J, Vreugdenhil E, Smit AB, Ibáñez CF, Geraerts WPM, Bulloch AGM (1998). Early evolutionary origin of the neurotrophin receptor family. *EMBO J* **17**:2534-2542
- Wang W, Lufkin T (2000). The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the

specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol* **227**:432-449

Wiesmann C, de Vos AM (2001). Nerve growth factor: structure and function. *Cell Mol Life Sci* **58**:748-759

Yan Q, Radeke MJ, Matheson CR, Talvenheimo J, Welcher AA, Feinstein SC (1997). Immunocytochemical localization of trkB in the central nervous system of the adult rat. *J Comp Neurol* **378**:135-157

Yuen EC, Mobley WC (1999). Early BDNF, NT-3, and NT-4 signaling events. *Exp Neurol* **159**:297-308