

00591
9

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

**HETEROGENEIDAD MOLECULAR Y
FISIOLÓGICA DE LAS NEURONAS TRHÉRGICAS
DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL
HIPOTÁLAMO DE LA RATA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA LA

M. en C. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del Departamento de Genética y Fisiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado en parte

Por el **CONACYT** (proyectos 33351-N, 31729-N) y la **DGAPA** (IN-216500)

Por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (**PAEP**) de la Dirección General de Estudios de Posgrado (**DGEP**) en los períodos 1999 y 2000.

Por la **DGEP** con una beca para realizar los estudios de Doctorado en el período de Febrero de 1997 a Julio del 2000

COMITÉ TUTORIAL:

DRA. PATRICIA I. JOSEPH BRAVO (ASESORA)

DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

DR. LUIS F. COVARRUBIAS ROBLES

JURADO DE EXAMEN:

PRESIDENTE: DR. FEDERICO SÁNCHEZ RODRÍGUEZ

SECRETARIO: DRA. PATRICIA I. JOSEPH BRAVO

VOCAL: DR. ALEJANDRO ALAGÓN CANO

VOCAL: DR. GABRIEL ROLDÁN ROLDÁN

VOCAL: DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO

SUPLENTE: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

SUPLENTE: DR. JESÚS SANTAOLALLA TAPIA

AGRADECIMIENTOS

A la Academia Mexicana de Ciencias

por haberme permitido participar en algunos de sus programas de apoyo a la investigación

A la Dirección General de Estudios de Posgrado

por haberme otorgado una beca durante mis estudios de Doctorado

A la Sociedad Internacional de Endocrinología

por el premio otorgado al trabajo presentado en el 82^{avo} Congreso Internacional de Endocrinología celebrado en Toronto, Canadá en Junio del 2000.

Al Instituto de Biotecnología – UNAM

Por haber financiado mi asistencia al XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas y al 27^{avo} Congreso Internacional de Neurociencias

A la Dra. Rosa Maria Uribe y al Dr. Jean Louis Charli por su participación crítica a lo largo de este proyecto y por su apoyo constante en mi desarrollo profesional.

Al Q.F.B. Miguel Cisneros, Sergio Trujillo y Manuel Villa por su invaluable apoyo técnico

Al Dr. Gabriel Corkidi por su colaboración en la parte analítica de este trabajo

A la Dra. Patricia Joseph por dirigir este trabajo

A la Q.F.B. Claudia Morales Chapa, Dra. Leonor Pérez Martínez, B. Magdalena Guerra Crespo y a la Q. Fidelia Romero Arteaga por el entrenamiento que me brindaron para la realización de distintas etapas a lo largo del proyecto.

Al personal del laboratorio

A Daniel, Naim y Alfonso

A la memoria de mi madre

**A Melissa, Sebastián, Haziél, Yannine, Christiane, Ximena, Dana y a los pequeñines que
nacerán próximamente**

A la niñez compartida con Mario

A Rulis, Lyz, Pablo, Ara y Bully

A mi papá

A mi abuelito Hilario

**A mis amigos de siempre:
Humberto, Fide, Alfonso, Magda, Martha,
Familias Fuchen Cuadras, Monje Ibarra,
Padilla Sánchez, Hernández Sánchez,
Sánchez Alemán, Mendoza Sánchez,
Gómez Aguirre y Sánchez Pérez**

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	VI
RESÚMEN	IX
ABSTRACT	X
INTRODUCCIÓN	1
HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA : TRH	1
<i>Estructura del gen de la TRH</i>	2
<i>Procesamiento del precursor de la TRH</i>	4
<i>Regulación hormonal del gen de la TRH</i>	6
<i>Regulación neural del gen de la TRH</i>	8
Estructura del PVN y proyecciones del núcleo hacia otras áreas del SNC y la neurohipófisis	9
<i>Aferencias sobre neuronas TRHérgicas del PVN</i>	11
EL SISTEMA TRHÉRGICO Y LA RESPUESTA AL FRÍO	15
<i>Respuesta autónoma al frío</i>	15
<i>Respuesta endócrina al frío</i>	17
<i>Interacción autónoma y neuroendócrina en el frío</i>	18
FISIOLOGIA DE LA LACTANCIA	20
<i>Participación de la TRH en la liberación de PRL inducida por la succión</i>	22
<i>Activación neuronal por el estímulo de la succión</i>	22
Neurotransmisores implicados en mediar la respuesta a la succión	23
<i>Adrenalina y noradrenalina</i>	23
<i>Serotonina</i>	23
<i>Histamina</i>	24
RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS	24
Activación del eje adrenal	24

<i>Expresión de genes tempranos</i>	26
Respuesta al estrés en la lactancia	27
JUSTIFICACIÓN	28
OBJETIVO PARTICULAR	29
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Animales	31
2. Cuantificación hormonal	31
3. Material	32
4. Marcado de sondas	32
4.1 Oligonucleótido de la TRH marcado con α -dATP [^{35}S]	32
4.2 Transcripción <i>in vitro</i> para el cRNA antisentido de <i>c-fos</i> utilizando α -UTP [^{35}S]	33
4.3 Transcripción <i>in vitro</i> para el cRNA antisentido de la TRH empleando UTP Digoxigenina (UTP-Dig)	35
4.3.1 Hidrólisis del cRNA de la TRH-dig	35
4.3.2 Detección del cRNA de la TRH-dig en membrana	36
5. Hibridaciones <i>in situ</i> (HIS)	37
5.1 Preparación de los tejidos	37
5.2 Hibridación <i>in situ</i> empleando el oligo de la TRH [^{35}S]	37
Lavados posteriores a la hibridación	38
5.3 Hibridación <i>in situ</i> empleando transcritos α -UTP [^{35}S]	38
5.4 Hibridación <i>in situ</i> empleando el cRNA de <i>c-fos</i> [^{35}S] y el transcrito hidrolizado de la TRH dig	39
5.4.1 Revelado de las laminillas con diaminobenzidina (DAB)	40
6. Detección de CREB y CREB fosforilado por inmunocitoquímica (ICC)	41
7. Cuantificación de la señal del RNAm de la TRH mediante el uso de un sistema analizador de imágenes	42
7.1 Conteo celular	44
7.2 Análisis de la señal del RNAm de la TRH por microscopía de campo oscuro	44

7.2.1	Análisis de la señal en el corte completo	44
7.2.2	Análisis de la señal regionalizando el PVN en celdas	45
7.2.3	Cartografía de la señal en el PVN	45
8.	Análisis estadístico	46
	RESULTADOS	47
	PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DEL RNAm DE LA TRH EN EL PVN DE MACHOS Y HEMBRAS VÍRGENES	47
	RESPUESTA DE MACHOS Y HEMBRAS VÍRGENES A 1 HR DE ESTIMULACIÓN POR FRÍO	50
	<i>Respuesta hormonal</i>	50
	<i>Análisis de la señal del RNAm de la TRH en el corte completo dividiendo al PVN en anterior, medio y posterior o en celdas</i>	50
	<i>Expresión de c-fos en el PVN de machos y hembras sometidos a 1 hr de estrés por frío</i>	53
	LACTANTES SOMETIDAS A ESTIMULACIÓN POR FRÍO	54
	<i>Respuesta hormonal</i>	54
	<i>Expresión del RNAm de la TRH en el PVN</i>	56
	<i>Expresión de c-fos en el PVN</i>	57
	LACTANTES SOMETIDAS A ESTIMULACIÓN POR SUCCIÓN	59
	<i>Respuesta hormonal</i>	59
	<i>Análisis de la expresión del RNAm de la TRH</i>	59
	LACTANTES SOMETIDAS A ESTIMULACIÓN POR SUCCION Y FRÍO	60
	<i>Análisis de la expresión del RNAm de la TRH</i>	62
	<i>Distribución de células con mayor concentración de RNAm de la TRH en el PVN de ratas lactantes estimuladas por frío y/o succión</i>	62
	DISCUSIÓN	66
	CONCLUSIONES	80
	PERSPECTIVAS	80
	REFERENCIAS	82

ÍNDICE DE TABLAS

		Página
Tabla I	Proyecciones del PVN hacia el SNC y la neurohipófisis	12
Tabla II	Aferencias nerviosas sobre el PVN	16
Tabla III	Niveles séricos de TSH y corticosterona en machos y hembras vírgenes aclimatados, sometidas a estimulación por frío	50
Tabla IV	Expresión del RNAm de <i>c-fos</i> en el PVN de machos y hembras expuestos a 1hr de estrés por frío	55
Tabla V	Niveles séricos de TSH, Corticosterona y PRL en hembras lactantes estimuladas por frío y/o succión.	56
Tabla VI	Expresión del RNAm de <i>c-fos</i> en el PVN de hembras lactantes expuestas a 1hr de estrés por frío.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representación esquemática del gen de la TRH	3
Figura 2	Diagramas representativos de la distribución de los distintos grupos celulares que conforman al PVN en cortes coronales en dirección rostral (A) a caudal (D)	10
Figura 3	Integración de la respuesta al frío	19
Figura 4	Imágenes representativas de la distribución de la señal para el RNAm de la TRH a través del PVN	43
Figura 5	Distribución del RNAm de la TRH en el PVN de machos y hembras adultos	49
Figura 6	Análisis de la expresión del RNAm de la TRH en el PVN de machos expuestos a 1 hr de estrés por frío	52
Figura 7	Expresión del RNAm de la TRH en el PVN de hembras vírgenes estimuladas por frío	53
Figura 8	Expresión del RNAm de la TRH en el PVN de ratas lactantes expuestas a frío o succión	58
Figura 9	Inducción de CREB fosforilado (CREBP-P) en neuronas del PVN de machos adultos sometidos a estrés agudo por éter	61
Figura 10	Expresión del RNAm de la TRH en el PVN de ratas lactantes expuestas a los estímulos de frío y de succión	63
Figura 11	Mapas representativos de células TRHérgicas en el PVN de hembras lactantes sometidas a los estímulos de frío y/o succión	65

ARTÍCULOS ANEXOS:

1. **Sánchez E, Uribe RM, Corkidi G, Zoeller RT, Cisneros M, Zacarias M, Morales-Chapa C, Charli JL and Joseph-Bravo P. Differential Responses of TRH Neurons to Cold Exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus. Neuroendocrinology 2001; 74: 407-422.**

2. **Sanchez E, Charli JL, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P and Uribe RM. Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. Brain Res. 1997; 761(1):77-86.**

ABREVIATURAS

α -MSH	Hormona estimulante de los melanocitos
5-HT	Serotonina
Ab	Anticuerpo
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
Adx	Adrenalectomizado
AGRP	Péptido relacionado con la proteína agouti
ANOVA	Análisis de varianza
ap	Región parvocelular anterior
AVP	Vasopresina
BAT	Tejido pardo adiposo
BSA	Albúmina bovina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CART	Transcrito regulado por anfetaminas y cocaína
CCTA	Con crías a temperatura ambiente
cDNA	DNA complementario
CREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP
CREBP-P	Proteína CREB fosforilada
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
CRIF	Factor inhibidor de la liberación de corticotropina
cRNA	RNA complementario
DA	Dopamina
DAB	Diaminobenzidina
dATP	deoxi- ATP
Dex	Dexametasona
DHIS	Doble hibridación <i>in situ</i>
Dig	Digoxigenina
DMN	Núcleo dorsomedial
DOI	Densidad óptica integrada

DTT	Ditiotreitol
DVC	Complejo vago dorsal
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFRE	Elemento de respuesta al factor de crecimiento epidérmico
EM	Eminencia media
ESM	Error estándar de la media
GABA	Acido gama amino butírico
GC	Glucocorticoides
GC-R	Receptor a glucocorticoides
GRE	Elemento de respuesta a glucocorticoides
HA	Hipotálamo anterior
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
ICC	Inmunocitoquímica
icv	Intracerebro ventricular
IEG's	Genes tempranos inmediatos
MC1-R	Receptor tipo 1 de melanocortina
MC4-R	Receptor tipo 4 de melanocortina
mp	Región parvocelular media
NBT	Cloruro de nitroazul de tetrazolio
NDM	Núcleo dorsomedial del hipotálamo
NGF1A	Factor de crecimiento nervioso tipo A
NGF1-B	Factor de crecimiento nervioso tipo B
NIDDK	National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
NPY	Neuropéptido Y
NTS	Núcleo del tracto solitario,
OXT	Oxitocina
PA	Fosfatasa alcalina
PACAP	Polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria
PAM	Peptidil-glicil α -monooxigenasa

PC1 y PC2	Proteínas convertasas 1 y 2
Pe N	Núcleo periventricular
PFQ7	prepro-TRH-178-184
POD	Peroxidasa
PRL	Prolactina
PS4	prepro-TRH-160-169
PS5	prepro-TRH-178-199
pSE14	prepro-TRH-186-199
PTU	Propiltiouracilo
PVN	Núcleo paraventricular
pv	Región periventricular
SCTA	Sin crías a temperatura ambiente
SNC	Sistema nervioso central
SON	Núcleo supraóptico
SRIH	Somatostatina
T. A	Temperatura ambiente
TBE	Tris boratos-EDTA
TH	Hormonas tiroideas
TH-R α	Receptor a hormona tiroidea alfa
TH-R β	Receptor a hormona tiroidea beta
TRH	Hormona liberadora de tirotropina
TSH	Tirotropina
T3, T4	Hormonas tiroideas

RESUMEN

La hormona liberadora de tirotropina (TRH) que se sintetiza en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) regula la síntesis y liberación de las hormonas tirotropina y prolactina. Estimulación aguda por 1hr de frío o 30 min de succión induce un aumento rápido y transitorio en la expresión del RNAm de la TRH que se postula, es de tipo transináptico. El objetivo de este trabajo consistió en determinar si en el NPV existen poblaciones de células TRHérgicas que responden de forma independiente a los estímulos de frío y de succión. Para ello se analizó la distribución regional del RNAm de la TRH en el NPV y además se buscaron marcadores que fueran exclusivos de la respuesta celular ya sea al frío o a la succión, con el fin de distinguir a una población de la otra. Se emplearon ratas Wistar a mitad de la lactancia para analizar al RNAm de la TRH por hibridación *in situ* (³⁵S) en cortes coronales del NPV de: a) lactantes sin crías sometidas a 1hr de frío o 30 min de succión, b) lactantes con crías sometidas a 1hr de frío, y c) lactantes sin crías sometidas a los estímulos combinados. El análisis del RNAm se realizó por microscopía de campo oscuro en el corte completo ó en celdas verticales que van del tercer ventrículo a la zona magnocelular, empleando un analizador de imágenes de Biocom.

Las ratas lactantes respondieron a los estímulos modulando su nivel de respuesta en el NPV de forma diferencial: mientras que las neuronas TRHérgicas de la zona anterior respondieron sólo al estímulo del frío, las de las zonas media y posterior respondieron tanto al frío como a la succión. La cuantificación por celdas mostró que en ambos paradigmas la señal se extiende de la zona periventricular hacia las otras las zonas parvocelulares del NPV. Esto sugiere, que si en verdad existen subpoblaciones, las neuronas no se segregan en una parte específica del núcleo.

Es posible que la respuesta esté confinada a sólo una parte de la población porque el número de células TRHérgicas con mayor concentración de RNAm aumenta alrededor del 25% en todos los grupos experimentales. Las poblaciones responsivas pudieran ser distintas porque al aplicar los estímulos combinados la población de neuronas con mayor concentración de RNAm se duplica mientras que el total permanece constante. El RNAm de *c-fos* se expresó en aproximadamente el 25% de las neuronas TRHérgicas del NPV de los grupos expuestos a frío pero no se expresó durante la succión. Tampoco se observó a CREBP-P en las ratas succionadas.

Nuestros resultados sugieren una subespecialización de las neuronas TRHérgicas que controlan la actividad del eje tiroideo y la liberación de prolactina en la condición fisiológica de la lactancia.

ABSTRACT

Thyrotropin-releasing hormone is a peptide synthesized in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) and released from the median eminence to the hypophysis where it controls the synthesis and release of thyrotropin and prolactin. In response to neural stimulation, provoked either by cold exposure or suckling, the levels of TRH mRNA in the PVN increase in a fast and transient manner. The aim of this work was to define whether TRHergic cells in the PVN exist as subpopulations that respond exclusively to each stimulus or, if the same cells are able to decode two different incoming signals. The regional distribution of responsive TRHergic cells was analyzed; transcription factors responding specifically to each stimulus were also searched. Wistar pregnant rats (mild lactation) were exposed to cold or suckling (60 and 30 min respectively) and brains were sliced coronally; TRH mRNA was detected by *in situ* hybridization (ISH) histochemistry using ³⁵S-oligonucleotide probe. Double ISH was performed using a dig-labeled probe for TRH and ³⁵S-cRNA probe for *c-fos*; anti-CREBP-P was analyzed in a contiguous slice where TRH mRNA was quantified. Lactating dams responded to cold stimulus in a similar fashion to male rats; label of responsive cells was distributed along the PVN, in the anterior, medial and posterior zones. In response to suckling, responsive cells were observed only in the medial and posterior zones. In response to cold, *c-fos* expression was increased in TRHergic cells and not after suckling stimulus. An increase in CREBP-P was demonstrated after a well recognized stressful stimulus such as ether exposure (in male rats) but not in lactating dams in response to either cold or suckling. It was not possible to identify an immediate early gene particular to suckling response. In order to visualize whether different cells respond to each stimulus, lactating dams were simultaneously exposed to cold and suckling; a higher number of responsive cells was detected but no particular cumulus were observed implying they are not confined to any particular area. However, the increased number of responsive cells suggest that TRHergic cells in the PVN are sub-specialized to control either the thyroid axis or lactation. Our results provide evidence of a functional specialization of TRH cells in the PVN.

INTRODUCCIÓN

HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA : TRH

La TRH (pGlu-His-ProNH₂) fue la primer hormona hipotalámica aislada y caracterizada por Guillemin y Schally considerada como la responsable de liberar tirotropina (TSH) de la hipófisis anterior [Guillemin, R., 1967., Schally, A.V. y col., 1969]. Las neuronas parvocelulares de las zonas media y periventricular del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, sintetizan a la TRH y la liberan de las terminales en la eminencia media (EM) del hipotálamo; la TRH es transportada hacia la hipófisis anterior a través del sistema portal-hipofisiario donde regula la síntesis y liberación de las hormonas tirotropina (TSH), prolactina (PRL) y, bajo condiciones específicas, hormona de crecimiento [Morley, J.E., 1981]. Un gran número de neuronas localizadas en el septo lateral, núcleo preóptico, hipocampo, tallo cerebral, núcleo motor dorsal del vago y materia gris ventral de la médula espinal también contienen proTRH [Lechan, R.M. y col., 1986 (b)], lo que sugiere que fuera del hipotálamo, la hormona podría tener un papel distinto al endócrino. De hecho la liberación de terminales sinápticas, unión a receptores de alta afinidad en diferentes zonas, efectos específicos sobre la actividad neuronal y presencia de peptidasas membranales capaces de inactivarlo [refs. en Griffiths, E.C. y Bennett, J.R., eds. 1983], lo califican como un neuromodulador o neurotransmisor. Fuera del sistema nervioso central (SNC), la TRH se sintetiza en las células β del páncreas [Aratan, S.S. y col., 1990], en la decidua de la placenta [Shambaugh, G.E. 3rd y col., 1983], la aurícula del corazón [Carnell, N.E. y col., 1992] y los testículos [Feng, P. y col., 1993] pero su función en estos tejidos es menos conocida.

Algunas de las funciones en las que la TRH participa incluyen la termoregulación, antagonismo de drogas sedantes, regulación del dolor [Reichlin, S., 1986], memoria [Khan, A. Y col., 1994], estimulación de movilidad gastrointestinal, secreción de ácido gástrico [Tache, Y. y col., 1989] vasodilatación y modulación del sistema inmune [Reichlin, S., 1986]. La TRH mejora la sobrevivencia neuronal en diferentes modelos de trauma en el SNC [Akdemir, H. y col., 1992] y también se han observado efectos positivos de la TRH en casos de daño a médula espinal y de atrofia muscular [Takeuchi, Y. y col., 1994]. Además, se han identificado cambios relacionados con la TRH en algunas condiciones patológicas, como por ejemplo en la enfermedad de Huntington [Spindel, E.R. y col., 1980], esquizofrenia [Nemeroff, C.B. y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Evans, D.L. 1984], epilepsia [Renming, X. y col.,1992], Alzheimer [Albert, M. y col., 1993], depresión [Lafer, B. y col.,1993], enfermedades primarias de la tiroides, adenomas hipofisiarios, anorexia nerviosa y otros trastornos metabólicos endócrinos [Duthie, S.M. y col.,1993]. En vista de la gran diversidad de actividades descritas para la TRH, es posible que el mejor conocimiento de la fisiología o fisiopatología de los distintos sistemas en los que la TRH participa, establezca nuevos blancos farmacológicos para el tratamiento de los diferentes desórdenes tanto metabólicos como neuropsiquiátricos en los que la hormona está implicada.

Estructura del gen de la TRH

El gen que codifica para la TRH se presenta en una copia en el genoma de la rata [Lee, S.L. y col.,1988]. La unidad transcripcional consta de 2.6 kb y contiene tres secuencias exónicas intercaladas con dos secuencias intrónicas. El exón 1 codifica para la región 5' no traducida del RNAm, el exón 2 codifica para el N-terminal y el péptido señal del precursor y el exón 3 codifica para 5 copias de la TRH, péptidos crípticos y la región 3' no traducida del RNAm. La transcripción y el procesamiento del RNA heteronuclear generan una molécula de RNAm de aproximadamente 1.65 Kb; la región 3' contiene varios elementos ricos en secuencias AU que podrían contribuir a una degradación rápida del RNAm.

Las secuencias necesarias para la regulación de la expresión génica, se localizan a lo largo de la región no codificadora del gen. La relevancia funcional de los sitios reguladores descritos en el promotor ha sido evaluada *in vitro*, utilizando genes reporteros acoplados a distintas partes de la región promotora del gen de la TRH de la rata [Balkan, W. y col., 1998], humano [Wilber, J.F. y Xu, A.H., 1998] o ratón [Satoh, T. y col., 1996., Ren, Y. y col., 1998]. La **figura 1** muestra un diagrama representativo del gen de la TRH en donde se señala la ubicación de los distintos elementos caracterizados dentro de la región promotora.

La región promotora del gen consta de una caja TATA en la posición - 29 con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) y una caja CG en la posición -119 que funciona como un elemento de respuesta (RE) a SP1 [Lee, S.L. y col.,1988]; éste y otro SP1RE localizado a -238 pb forman los elementos de respuesta al factor de crecimiento epidérmico (EGF) identificados en el gen del ratón [Ren, Y. y col., 1998]. Se conocen 2 elementos imperfectos de respuesta a AMP cíclico (cAMP), localizados entre la posición -100 y -59 que son capaces

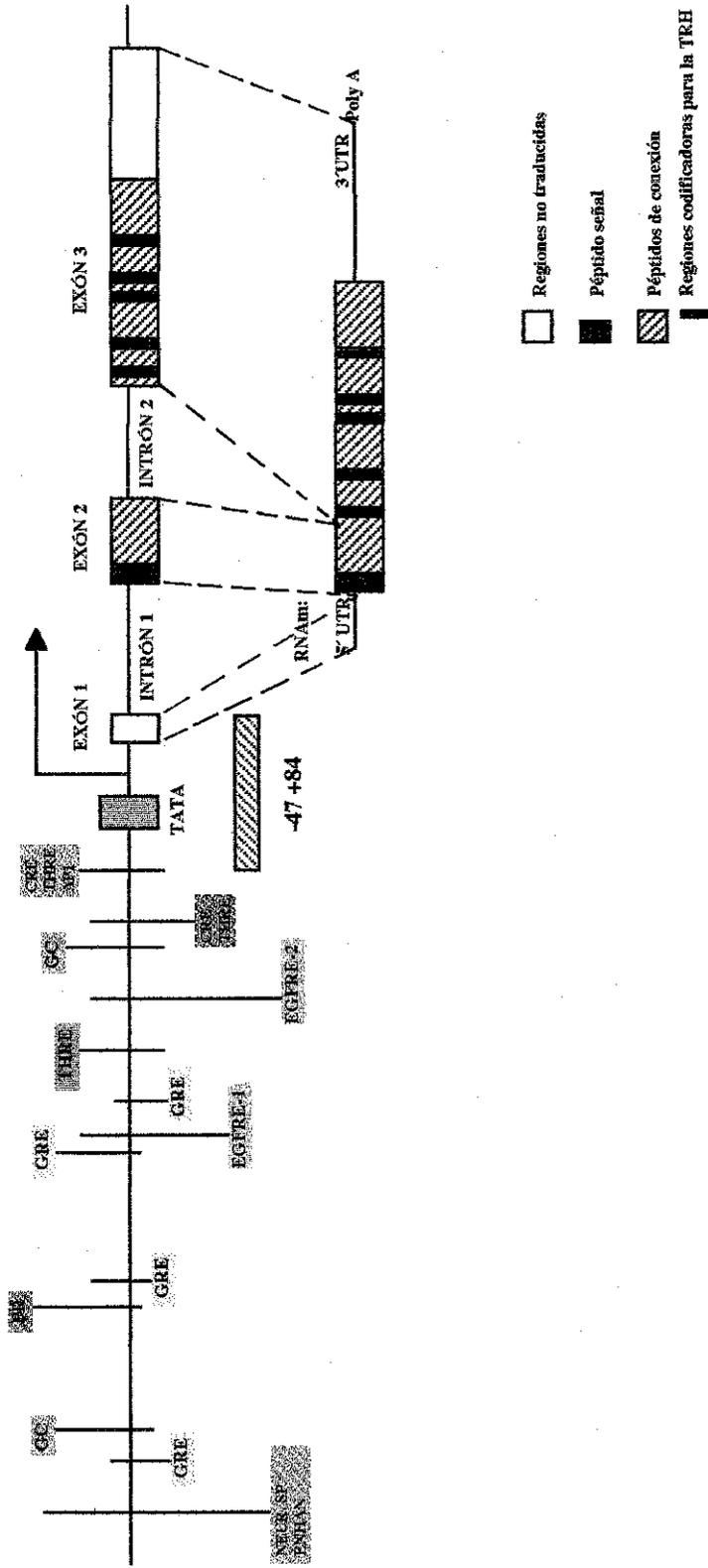


Figura 1. Representación esquemática del gen de la TRH. El esquema señala las secuencias reguladoras descritas para el gen de la TRH así como las posiciones relativas de las mismas en relación al sitio de inicio de la transcripción (flecha) y la posición relativa de las secuencias que codifican para las 5 copias de la TRH y los péptidos de conexión. La región promotora contiene una caja TATA y 2 cajas GC que posiblemente participan en la actividad basal del promotor. De izquierda a derecha se muestra un elemento amplificador específico de neuronas, varios elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE), elementos de respuesta a hormonas tiroideas (THRE), a AMPc (CRE), a factor de crecimiento epidérmico (EGFRE 1 y 2), a AP1 y una región reguladora de -47 a +84 necesaria para la expresión tejida específica del gen. (Referencias a las secuencias descritas en: Lee, S.L. y col., 1989., Evans, R.M. y Hollenberg, S.M., 1988., Balkan, W. y col., 1998., Hollenberg, A.N. y col., 1995., Satoh, T. y col., 1996).

de unir tanto a la proteína de unión al elemento de respuesta a cAMP (CREBP) como a *c-jun* [Yang, IM., 1992]. Wang demostró que uno de estos sitios (el de -59 pb) une al receptor de hormona tiroidea (TH-R) además de CREBP y *c-jun* (Wang, M, Lee). Existe otro sitio de unión a TH-R en la posición -142 [Lee, S.L. y col.,1988], un elemento de respuesta perfecto al receptor de glucocorticoides (GRE) TGTTCT que se encuentra a -210 pb [Lee, G.C. y col.,1996] y otro GRE a -284 pb [Evans, R.M., y Hollenberg, S.M., 1988]. Otra porción secuenciada de la región promotora del gen de la TRH de la rata [Balkan, W. y col., 1998] mostró regiones reguladoras adicionales como la secuencia de 10 pb en la posición -351 que es similar a otra presente en el gen del péptido natriurético atrial, la secuencia que confiere expresión específica en corazón y que es homóloga al elemento de respuesta del suero [Argentin, S. y col., 1994]; dos medios sitios a GRE contenidos en dos homólogos repetidos a -580 pb y -755 pb; una caja GC que interacciona con SP1 a -693 pb y la secuencia CCAGG a -770 pb que es idéntica a un elemento enhancer específico de neuronas [Maue, R.A. y col., 1990]. Balkan, W. y col., describieron una región reguladora en ratones transgénicos, que es suficiente para la expresión del gen de la TRH en tejidos que normalmente lo expresan de manera abundante. Esta incluye a la mayor parte del Exón 1 de la rata (84 de 103 pb) y a una parte de la región promotora del gen (-47 a +84 pb). Adicionalmente se han descrito dos elementos de respuesta al factor de crecimiento epidérmico entre las regiones -254 a -218 (EGFRE1) y -130 a -84 (EGFRE2) en el gen de la TRH del ratón. Mientras que el sitio 1 es rico en TC y contiene una secuencia homóloga a un sitio de unión a SP1 (CCCCTCCC) - identificado también en el receptor de acetil colina $\alpha 3$ -, la secuencia del EGFRE2 es rica en GC y posee una secuencia consenso para unión a SP1 (GGGCGG) [Satoh, T. y col., 1996].

Procesamiento del precursor de la TRH

Al igual que la mayoría de los neuropéptidos, la TRH se sintetiza a partir del corte proteolítico de una proteína precursora de alto peso molecular; la caracterización de distintos cDNAs de la TRH tanto de mamíferos como de anfibio ha mostrado que la molécula precursora posee varias copias del péptido flanqueadas por pares de aminoácidos básicos y péptidos crípticos [Cockle, S.M., y Smyth, D.G., 1987., Sevarino, K.A. y col., 1989].

La secuencia de aminoácidos deducida a partir del cDNA de la rata muestra que el precursor tiene un peso molecular de 29 Kda con 5 copias de la secuencia que dará origen a la TRH (Gln-His-Pro-Gly) y 7 péptidos crípticos [Wu, P. y col., 1987]. Las secuencias que codifican para la TRH se encuentran flanqueadas por pares de aa básicos Lys-Arg en el extremo N-terminal del precursor y por pares de aa básicos Lys-Arg o Arg-Arg en el extremo C-terminal. Estudios *in vitro*, tanto con membranas de vesículas hipofisarias como en líneas celulares transfectadas con el cDNA de la TRH, han mostrado que las convertasas PC1 y PC2 procesan de forma eficiente al precursor de la TRH [Friedman, T.C. y col., 1995., Nillni, E.A. y col., 1995., Schaner, P. y col., 1997] mientras que estudios de colocalización, tanto en cultivos primarios [Nillni, E.A. y col., 1996] como en cortes de tejido [Pu, L.P. y col., 1996., Sánchez, E. y col., 1997], han sugerido que estas enzimas podrían ser las responsables del procesamiento proteolítico del precursor *in vivo*.

Posterior al primer corte endoproteolítico del precursor se lleva a cabo la remoción de los residuos básicos por una carboxipeptidasa B y se inicia una cascada de eventos enzimáticos que traen como consecuencia la modificación de las secuencias Gln-His-Pro-Gly en los extremos amino y carboxilo terminal para generar a la TRH madura. La glutamina es transformada a pGlu por una glutaminil ciclase y la glicina C-terminal es hidrolizada por la enzima peptidil-glicil α -monooxigenasa (PAM) para amidar a la prolina en el carbono α .

Los péptidos crípticos que se generan a partir del procesamiento completo del precursor incluyen al prepro-TRH (25-50), (53-74), (83-106), (115-151), (160-169), (178-199), (208-255) y a los recientemente descritos prepro-TRH (178-184) y (186-199) que se generan a partir del procesamiento de la secuencia 178-199 [Nillni, E.A. y col., 2001]. El significado biológico para la mayoría de los péptidos crípticos y las secuencias extendidas de la TRH (estos últimos están presentes en otras partes del SNC pero no en el PVN) se desconoce. Se sabe que el péptido críptico **Ps4** (prepro-TRH-160-169) potencia el efecto de la TRH sobre la liberación de TSH en células adenohipofisarias [Bulant, M. y col., 1990]; si Ps4 se inyecta vía intracerebroventricular (icv) aumenta la síntesis del RNAm de la subunidad β de TSH y el RNAm de PRL [Carr, F.E. y col., 1992]. **Ps5** (prepro-TRH-178-199) inhibe la síntesis y secreción de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) *in vitro* tanto en condiciones basales como en respuesta a estimulación por CRH [Redei, E. y col., 1995] y disminuye de forma

significativa la liberación de GH inducida por la TRH en fragmentos de hipófisis anterior de rata [Roussel, J.P. y col., 1994]. El efecto de Ps5 como factor inhibidor de la liberación de corticotropina (CRIF) se demostró *in vivo* al observar que el péptido atenúa la respuesta del eje adrenal al estrés por inmovilización si se administra *iv* [McGivern, R. y col., 1997].

PFQ7 (prepro-TRH-178-184) y **pSE14** (prepro-TRH-186-199), se generan a partir del procesamiento de Ps5 por la convertasa PC2. Estos péptidos están presentes en el PVN de la rata y ambos son capaces de aumentar la liberación de PRL pero no de TSH en cultivos primarios de células hipofisarias [Nillni, E.A. y col., 2001]. Adicionalmente, Ps5 y pSE14 aumentan de forma significativa en el PVN de ratas sometidas a succión aguda al cuarto día de lactancia continua; esto sugiere que ambos péptidos podrían ser importantes en la regulación fisiológica de la secreción de PRL. El procesamiento diferencial del precursor (total o parcial) en los distintos tejidos podría ser un punto clave en el patrón de las respuestas a distintos estímulos.

Regulación hormonal del gen de la TRH

Diferentes evidencias experimentales muestran que las hormonas tiroideas (TH) T3 y T4, participan en la regulación de la biosíntesis de la TRH que se sintetiza en las neuronas del PVN. El hipotiroidismo inducido por administración *ip* de propiltiouracilo (PTU) incrementa la expresión del RNAm de la TRH y del proTRH en la región parvocelular media del PVN, pero no en otras zonas del cerebro como el hipotálamo anterior (HA) o el núcleo reticular del tálamo [Segerson, T.P. y col., 1987]. Además del efecto del PTU sobre el RNAm de la TRH en el PVN, la administración de T3 reduce los niveles del RNAm de la TRH en ratas hipotiroideas a niveles similares a lo observado en ratas eutiroideas [Koller, K.J. y col., 1987]. El implante de cristales de T3 adyacente al PVN reduce los niveles del RNAm de la TRH y de proTRH sólo en el lado del núcleo en el que se coloca el implante lo cual demuestra que el efecto de las TH sobre la expresión del RNAm de la TRH es directo [Dyess, E.M. y col., 1988]. A la fecha se han investigado más zonas dentro del SNC en donde la expresión del RNAm de la TRH podría ser regulada por TH y excepto para las neuronas que sintetizan a la TRH en la zona caudal del Rafé en la médula oblongada [Yang, H. y col., 1999] no se ha encontrado respuesta al efecto retroalimentador de las TH en otras zonas del cerebro. El

mecanismo por el cual las TH suprimen la expresión del gen de la TRH en el PVN, se desconoce. Sin embargo, la expresión diferencial de las distintas isoformas de los receptores α y β tiroideos (TH-Rs) en las neuronas del PVN sugiere que las TH regulan de manera directa la expresión del gen de la TRH en el PVN. Las isoformas $\alpha 1$ y $\beta 2$ de los TH-Rs se expresan en altas concentraciones en el 90 y 84% de las neuronas TRHérgicas del PVN respectivamente. Si bien el TH- $\beta 1$ también se expresa en la mayoría de las neuronas, su patrón de tinción es débil. El TH- $\alpha 2$ es un receptor truncado porque tiene el dominio de unión a DNA pero no el de la hormona; TH- $\alpha 2$ se expresa en una subpoblación de células TRHérgicas en el PVN y su patrón de tinción en condiciones basales también es débil [Lechan, R.M. y col., 1994]. Por otro lado, la expresión de fragmentos de la región promotora del gen de la TRH en líneas celulares de humano, que contienen las secuencias de unión a TH, muestran que estos sitios son esenciales para la regulación negativa de la transcripción del gen por TH [Hollenberg, A.N. y col., 1995., Satoh, T. y col., 1996]. Feng, P. y col., en 1994, demostraron el efecto dependiente de T3 para los distintos receptores (excepto el truncado) sobre la transcripción del gen de la TRH de humano en células de neuroblastoma cotransfectadas con genes reporteros unidos a la región promotora del gen de la TRH. Los resultados *in vitro* sugieren que las interacciones DNA-Proteína de los distintos TH-Rs sobre el gen de la TRH modulan la actividad transcripcional del gen en respuesta a TH.

Los glucocorticoides (GC) pertenecen a la familia de hormonas esteroides y tienen un efecto inhibitor *in vivo* sobre la expresión del gen de la TRH en las neuronas del PVN [Kakucska, I. y col., 1995]. La expresión del RNAm de la TRH aumenta 12 días después de haber adrenalectomizado (adx) a ratas adultas y el efecto contrario se observa en animales normales que son tratados con dexametasona (Dex), un corticoide sintético que se une al receptor de GC (GC-R) o con corticosterona por un período de tiempo similar al estudiado en los animales adx [Kakucska, I. y col., 1995]. La acción de los GC podría ser directa porque el GC-R está presente en las neuronas TRHérgicas del PVN [Cintra, A. y col., 1990] y porque la región promotora del gen de la TRH en la rata, tiene secuencias consenso de reconocimiento al GC-R [Lee, S.L. y col., 1988]. Contrario al efecto inhibitor de los GC sobre la expresión del RNAm de la TRH *in vivo*, la transfección de regiones del promotor de la TRH (que contienen los

sitios de unión a GC-R) unidas a genes reporteros en células HeLa, ha mostrado que Dex aumenta la actividad transcripcional del gen de la TRH y además, que el sitio de reconocimiento del GC-R es funcional y confiere activación *in vitro* [Lee, G.C. y col.,1996]. El tratamiento continuo con corticosterona o Dex, también aumenta el nivel de RNAm de la TRH de células adenohipofisarias en cultivo [Bruhn, T.O. y col.,1994] o de células de diencéfalo en cultivo [Luo, L.G. y col.,1995]. Las respuestas observadas *in vitro* parecen ser dependientes del tiempo de exposición a la droga y de la dosis empleada en el ensayo ya que a tiempos cortos de incubación con la Dex (1-3 hrs), la expresión del gen de la TRH disminuye o aumenta en cultivos primarios de hipotálamo de rata dependiendo de la dosis empleada (10^{-10} y 10^{-8-6} respectivamente) y el efecto estimulador se pierde si la Dex se mide a tiempos más largos en el cultivo (24 hrs) [Joseph-Bravo, P. y col.,1998]. La activación del gen de la TRH por segundos mensajeros se inhibe en distintas proporciones si las células se incuban con una mezcla de glucocorticoides y AMPc, AMPc y ésteres de forbol o bien con una combinación de los tres, pero no cuando se combina Dex y ésteres de forbol [Pérez-Martínez, L. y col.,1998]. Las diferencias en la expresión del gen de la TRH dependientes de la activación de segundos mensajeros en presencia de factores hormonales como los glucocorticoides podrían ser relevantes fisiológicamente. La variabilidad de la respuesta de la neurona TRHérgica *in vivo* podría depender de los elementos que esta utilice para responder a un estímulo dado así como de los efectores que la activen (neurotransmisores, hormonas esteroides, péptidos, etc). Se ha propuesto que la Dex induce cambios tanto en la síntesis *de novo* del proTRH como en el procesamiento del precursor, aumentando tanto la velocidad de traducción como el procesamiento del pro-TRH para generar más TRH [Bruhn, T. y col., en 1998] pero el mecanismo se desconoce. No obstante, los glucocorticoides podrían actuar directa o indirectamente regulando la expresión de los genes que codifican para las enzimas que participan en el procesamiento del precursor.

Regulación neural del gen de la TRH

Antes de describir las aferencias que llegan a las neuronas TRHérgicas del PVN, es importante tener una visión general de las poblaciones celulares que conforman el núcleo, así como de los

sitios blanco a los que estas distintas poblaciones hacen llegar sus prolongaciones o terminales nerviosas.

Estructura del PVN y proyecciones del núcleo hacia otras áreas del SNC y la neurohipófisis

El PVN es un complejo de componentes distintos tanto parvocelulares como magnocelulares que en su totalidad forman al menos ocho grupos celulares [Swanson, L.W., y Kuypers, H.G.,1980]. La **figura 2** muestra un diagrama representativo de la localización de todas las subdivisiones del PVN en cortes coronales en dirección rostral a caudal. El núcleo está conformado por tres grupos densos de neuronas magnocelulares (*anterior, media y posterior*) y cinco grupos de neuronas parvocelulares (*anterior, media, dorsal, lateral y periventricular*). La zona *magnocelular anterior*, yace ventromedial al fórnix, a nivel del área preóptica y corresponde a la mayor parte del núcleo comisural anterior de Peterson [Peterson, R.P., 1966]. La zona *magnocelular media* está conformada por un pequeño grupo de células grandes embebido en las zonas periventricular y parvocelular anterior del núcleo, entre el grupo de células magnocelulares anterior y posterior; por tinción de Nissl el magno anterior y el medio se encuentran conectados sólo por algunas células grandes dispersas. La zona de mayor tamaño es la *magnocelular posterior* y es la más citada en la literatura. Hatton, G.I. y col., en 1976, subdividieron a este grupo de células en rostromedial y caudolateral. *La parte anterior de la zona magnocelular posterior contiene una región en donde las neuronas magnocelulares y parvocelulares se encuentran entremezcladas.* En cuanto a las neuronas parvocelulares, la zona *parvocelular anterior* contiene células dispersas de tamaño mediano a pequeño entre las zonas magnocelular anterior y periventricular del PVN, alargándose del polo rostral del magno anterior al límite anterior del magno posterior. Rioch, D.T. (en gato y en perro), Rose, M. (en conejo) y Bleier, R. (en ratón) [Refs. En Swanson, L.W., y Kuypers, H.G.,1980], consideraron este grupo de células como la parte rostral del PVN mientras que Loo Y.T., 1931, lo clasificó como el núcleo preóptico anterior; este grupo de células está separado del parvo medio al inicio de la zona rostral magnocelular posterior, por una región estrecha de células dispersas sin límites reconocibles. La zona *parvocelular media* consta de un grupo de células pequeñas densamente empacadas y aparentemente abarca una parte importante del

ORGANIZACION ESTRUCTURAL DEL NPV

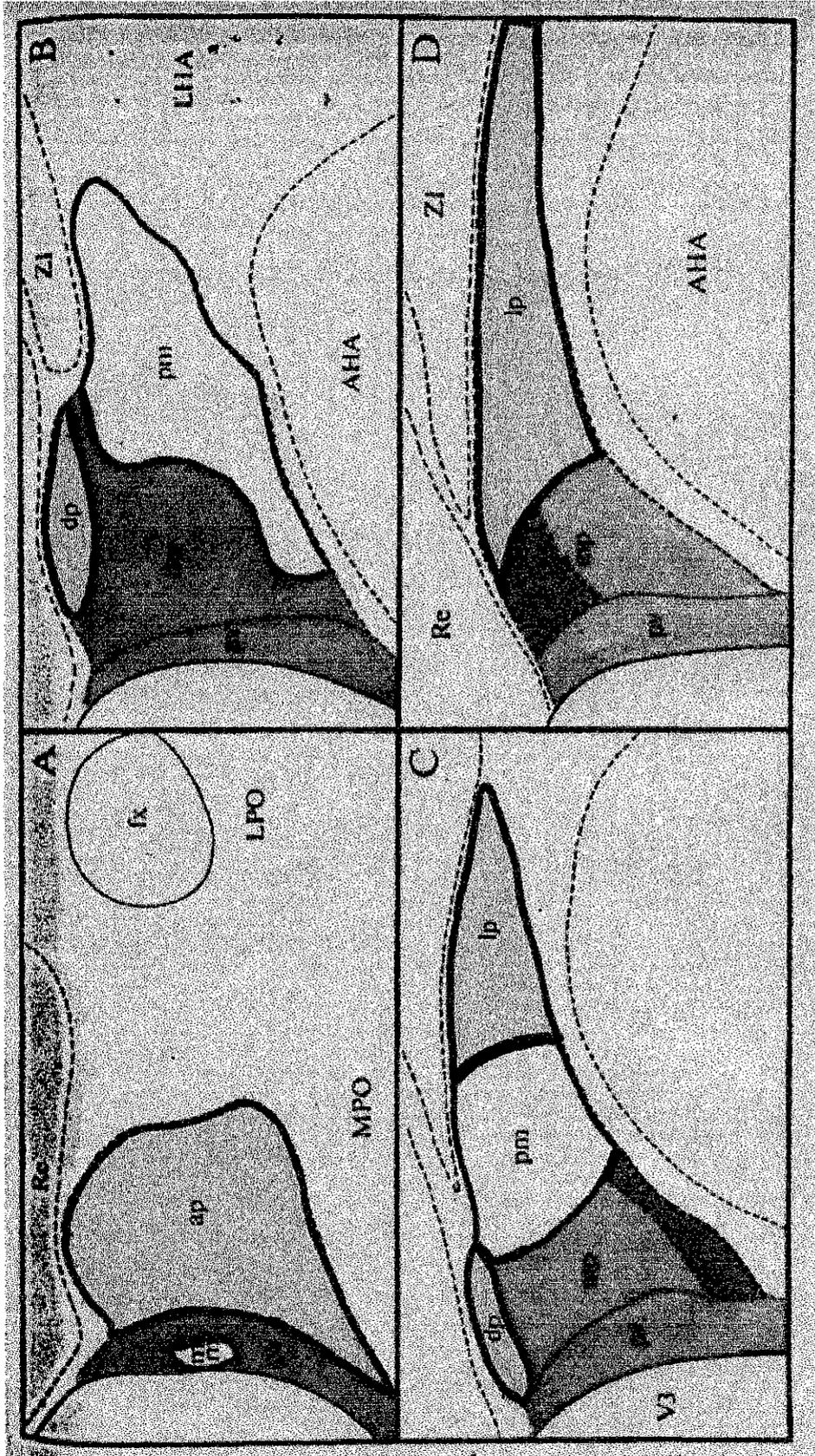


Figura 2. Diagramas representativos de la distribución de los distintos grupos celulares que conforman al NPV en cortes coronales en dirección rostral (A) a caudal (D). Abreviaturas: mm=media magnocelular, pv= periventricular, ap=anterior parvocelular, MPO=zona preóptica media, LPO=zona preóptica lateral, fx=fómix, mp= media parvocelular, dp= dorsal parvocelular, pm= posterior magnocelular, AHA= hipotálamo anterior, LHA= hipotálamo lateral, V3= tercer ventrículo, lp= lateral parvocelular, Re= reticular talámico, ZI= zona incerta. Las zonas en naranja se consideran la parte endócrina del núcleo mientras que las grises se consideran como la parte autónoma. En blanco se muestran las zonas magno que inervan a la neurohipófisis. (Modificado de Swanson, LW y Kuypers, HGJM., 1980. The Journal of Comparative neurology (194): 555-570).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

núcleo. La zona *parvocelular lateral* yace lateral y caudal a la zona magnocelular posterior y contiene neuronas que son principalmente de tamaño medio; éstas tienden a tener una orientación horizontal y caudalmente, se extienden lateralmente sobre la columna descendente del fórnix para convergir con el núcleo perifornical de Peterson. La zona *parvocelular dorsal* conforma un grupo distintivo de células en forma de lente, de tamaño medio, orientadas horizontalmente y, dorsales al magno posterior y al parvo anterior. La zona *periventricular* ha sido identificada por la mayoría de los autores y se ha considerado por algunos como parte de la división parvocelular del PVN. Se distingue por la orientación vertical de la mayoría de sus células. Cabe mencionar que aunque la subdivisión parvocelular está compuesta principalmente de células de tamaño mediano a pequeño, también se pueden encontrar de forma escasa algunas células grandes en cada una de las subdivisiones. La **tabla I** resume los sitios blanco tanto de las neuronas parvocelulares como de las magnocelulares en el SNC y en la neurohipófisis. Como se puede apreciar, mientras que la mayor parte de la población magnocelular inerva a la neurohipófisis (muy pocas células dirigen sus terminales a la eminencia media), la población parvocelular es más heterogénea. De hecho, las neuronas parvo que inervan eminencia media se consideran como la parte *neuroendócrina* del núcleo mientras que las que inervan a médula y/o tallo cerebral se consideran como la parte *autónoma* del mismo.

Aferencias sobre neuronas TRHérgicas del PVN

Como se mencionó en un principio, las neuronas parvocelulares de las zonas media y periventricular del PVN, sintetizan a la TRH que controla la actividad del eje tiroideo [Ishikawa, K. y col., 1988]. En general, las neuronas que sintetizan a la TRH en el PVN, reciben un gran número de contactos sinápticos en sus somas y/o dendritas provenientes de varias zonas del SNC. Las neuronas son inervadas de forma diferencial dependiendo de la región parvocelular en la que se localicen. Por ejemplo, sólo las neuronas de la región periventricular (pv) y media parvocelular (mp) reciben inervación densa de noradrenalina y adrenalina [Liposits, Z. y col., 1987] de la cual, el 10-21% proviene de las catecolaminas del tallo cerebral [Shioda, S. y Nakai, Y., 1993]. Las zonas mp y pv reciben aferencias de neuronas TRHérgicas [Toni, R. y col., 1990 (b)., Kiss, J. y Halasz, B., 1990] o de

Tabla I. Proyecciones del NPV hacia el SNC y la neurohipófisis

Grupo celular en el NPV	Células blanco	Referencia bibliográfica
<p>Las 5 subdivisiones parvocelulares y células escasas de la magno posterior</p> <p>Parvocelular anterior, medio y lateral (muy pocas células del NPV dorsal o periventricular)</p>	<p>Médula espinal, grupos preganglionares del SNA en tallo cerebral, locus coeruleus y Eminencia media. <i>**ninguna de las ap, pv o mp dorsal que proyectan a EM, proyecta a médula oblongada, médula espinal o tallo cerebral.</i></p> <p>Complejo vago dorsal (CVD) A) de las que inervan CVD un 10-15% también inerva a médula espinal. B) Las células que inervan a médula o a CVD son distintas de las que inervan Neurohipófisis <i>** hay conexiones recíprocas entre el NPV y locus coeruleus</i></p>	<p>Swanson, L.W. y Kuypers, H.G., 1980.</p>
<p>Parvocelular anterior</p>	<p>Un número sustancial proyecta a la EM <i>* se desconoce la mayoría de las eferencias de esta región</i></p>	<p>Swanson, L.W. y Sawchenko, P.E. 1983.</p>
<p>Periventricular rostral inmerso en parvo anterior, parvo medio y magnocelular lateral (un No.< de la zona rostral y dorsal del PVN)</p>	<p>Eminencia media <i>*las pv y mp que proyectan a EM son neuronas pequeñas con proyecciones relativamente cortas</i></p>	<p>Ishikawa, K., et al., 1988. Larsen, P.J., et al., 1991.</p>
<p>Parvo medio</p>	<p>Contiene neuronas que proyectan al órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) (son TRHérgicas)</p>	<p>Merchenthaler, I. y Liposits, Z., 1994.</p>
<p>NPV magnocelular</p>	<p>Tiene dendritas que se extienden hacia el IIIV, lo que supone contactos con otras zonas del NPV</p>	<p>Van den Pol, A. N., 1982</p>
<p>Magnocelular anterior, media y posterior</p>	<p>Neurohipófisis</p>	<p>Swanson, L.W. y Kuypers, H.G., 1980.</p>

neuronas que sintetizan hormona liberadora de corticotropina (CRH) [Hisano, S. y col.,1993] que muestran conexiones recíprocas. Si bien algunos contactos podrían provenir del hipocampo [Herman, J.P. y col., 1992], el origen de las proyecciones al PVN así como la funcionalidad de las mismas se desconoce. Además de esta inervación, las neuronas TRHérgicas del PVN reciben aferencias de otros péptidos. El polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) inerva cuerpos y dendritas de las neuronas TRHérgicas del PVN pero al igual que CRH, se desconoce tanto el origen de las proyecciones como su posible función [Legradi, G. y col.,1997 (b)]. Es posible que las neuronas neuroendócrinas del PVN se encuentren comunicadas entre sí, a través de redes sinápticas, que les permitan integrar diversas actividades neuroendócrinas.

Las aferencias que llegan desde el núcleo arcuato hacia los somas y las dendritas de las neuronas TRHérgicas proximales son del tipo inhibitorio. Hay una inervación que contiene al neuropéptido Y (NPY), que se localiza en las neuronas de las zonas parvocelular anterior (ap), mp y pv [Toni, R. y col.,1990 (a)]. Estas sinapsis juegan un papel importante en la respuesta al ayuno ya que bajo esta condición, se observa una disminución general en la actividad del eje tiroideo que correlaciona con la actividad aumentada de las neuronas del núcleo arcuato mientras que, la lesión neurotóxica del núcleo arcuato, por administración de glutamato monosódico a neonatos, evita la reducción de la expresión del RNAm de la TRH en el PVN y de TH circulantes inducida por el ayuno [Legradi, G. y col.,1998]. Por otro lado, se presume que las aferencias de NPY que llegan del tallo cerebral son del tipo excitador [Diano, S. y col.,1998]; estas neuronas contactan a las TRHérgicas del PVN en dendritas lejanas y husos dendríticos y se cree que la inervación también es catecolaminérgica porque NPY colocaliza con noradrenalina/adrenalina en tallo cerebral [Sawchenko, P. E. y col.,1985].

El péptido relacionado con la proteína agouti (AGRP), se sintetiza en las mismas neuronas del núcleo arcuato que producen a NPY e inerva de forma densa tanto somas como dendritas de neuronas TRHérgicas en el PVN [Legradi, G. y Lechan, R.M.,1999]. AGRP se considera como un antagonista endógeno de la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH)

[Bagnol, D. y col.,1999] y, al igual que NPY su efecto sobre la expresión del gen de la TRH es del tipo inhibitoras [Fekete, C. y col., 2000(a)]. Recientemente se describieron proyecciones adicionales de otros péptidos sobre las TRHérgicas del PVN; el transcrito regulado por anfetaminas y cocaína (CART) y α -MSH colocalizan en terminales nerviosas que inervan neuronas TRHérgicas. CART y α -MSH se sintetizan en las mismas células del núcleo arcuato [Fekete, C. y col., 2000(b)] pero sólo la mitad de éstas células inervan al PVN [Sawchenko, P.E. y col.,1982]; el resto de las células CART que inervan al PVN proviene de sitios distintos al núcleo arcuato. CART inerva el 10% de las TRHérgicas del ap, 80% de las pv y 80% de las mp y administrado intracerebro ventricularmente (icv), revierte el efecto negativo del ayuno sobre la expresión del RNAm de la TRH en el PVN en un 93% [Fekete, C. y col., 2000(b)]. α -MSH inerva el 70% de las ap y pv y el 72% de las mp rostrales en cuerpos y dendritas cercanas y al igual que CART, revierte el efecto negativo del ayuno sobre la expresión del RNAm de la TRH en el PVN en un 87% [Fekete, C. y col., 2000(a)]. La capacidad de CART y α -MSH para regular la expresión del gen de la TRH durante el ayuno sugiere que ambos péptidos podrían modular a las neuronas TRHérgicas que controlan la actividad del eje tiroideo; sin embargo, dado que ninguno reestablece la actividad del eje en su totalidad (los niveles de T3 y T4 no se reestablecen completamente), es de suponer que CART y α -MSH median sólo parte de los efectos del ayuno.

Las neuronas ap, pv y mp que hacen sinapsis con α -MSH son inervadas a su vez por AGRP. Sin embargo, mientras que la mayor parte de las neuronas TRHérgicas dorsales (dp) son inervadas por AGRP, sólo el 47% tiene a α -MSH y el 34% de las neuronas del mp caudal es inervado por AGRP y por α -MSH. Dado que no todas las neuronas inervadas por AGRP contienen a α -MSH, es posible que AGRP actúe de forma independiente al antagonismo sobre α -MSH en esta otra subpoblación de neuronas. Ambos péptidos se unen a receptores tipo 4 de melanocortina (MC4-R) [Adan, R.A. y col.,1994] y los receptores están presentes en neuronas parvocelulares del PVN [Mountjoy, K.G. y col.,1994]. Por tanto, la presencia de axones de α -MSH y AGRP sobre una misma neurona TRHérgica sugiere la interacción de ambos sistemas para regular la transcripción del RNAm de la TRH.

Recientemente se describieron prolongaciones de neuronas del núcleo dorsomedial del hipotálamo (DMN) haciendo contacto con neuronas TRHérgicas del PVN [Mihály, E. y col., 2001]. La parte media-dorsal del DMN inerva a casi todas las neuronas TRHérgicas (98%) de las zonas parvocelulares ap, pv, mp y dp del PVN, mientras que la parte media-ventral inerva sólo al 39 % de las neuronas TRHérgicas de la región ap, 69% de la región pv, 51% de la mp y menos del 50% de la región dp. La inervación del DMN podría participar de forma importante en la regulación de la expresión del gen de la TRH aunque se desconocen las moléculas que están presentes en los contactos sinápticos. El DMN sintetiza un gran número de moléculas neurotransmisoras y neuromoduladoras a través de las cuales podría regular la actividad del eje tiroideo. El ácido gamma amino butírico (GABA) por ejemplo, disminuye los niveles de la TSH en el suero y antagonistas a GABA modifican el ciclo circadiano de la TSH [Jordan, C., 1983]; la acción de este neurotransmisor podría estar relacionada con la transmisión de señales del DMN al PVN. Por otra parte, el DMN modula de forma importante el balance energético del organismo y podría estar implicado en la modulación de la sensibilidad del eje tiroideo al efecto retroalimentador por TH circulantes.

Si bien ha habido un avance importante en la identificación de moléculas que inciden en distintos grados sobre las neuronas TRHérgicas del PVN, la complejidad del sistema parece ser mucho mayor. Es importante tener en cuenta que la mayoría de las moléculas descritas proviene solamente de uno de los núcleos hipotalámicos que inervan al PVN.

En la **tabla II** se describen las distintas proyecciones que inciden en el PVN, provenientes de la mayoría de los núcleos que conforman al hipotálamo, así como prolongaciones del rafe, tallo cerebral y algunas otras zonas del SNC. Indudablemente, los sitios aquí descritos son candidatos potenciales que podrían estar modulando la actividad de las neuronas TRHérgicas en condiciones fisiológicas específicas a través de la liberación de neurotransmisores que a la fecha se desconocen.

Tabla II. Aferencias nerviosas sobre el NPV

Lugar de origen de la proyección:	Péptido o NT que sintetiza	Células blanco en el NPV	Referencia bibliográfica
Hipotálamo: Hipotálamo anterior, lateral, núcleo supraquiasmático, ventromedial, dorsomedial, premamilar, supramamilar, preóptico mediano, periventricular preóptico, Area preóptica media y lateral.	???	Inervación densa al parvo Neuroendócrino (pv y mp dorsal) Moderada al parvo autónomo (mp ventral, dp y lp).	Sawchenko, P. y Swanson, L.W., 1983. Larsen, P.J., et al.,1994.
Hipotálamo anterior, núcleo del lecho de la estria terminal, NTS, área preóptica, NDM, quiasma óptico, NSQ	GABA	Todo el NPV	Boudaba, C., et al., 1996
Hipotálamo lateral -caudal	Sustancia P	Neuronas de CRF en parvo dorsal y medio	Jessop, D.S., et al.,1992. Chowdrey, H.S., et al., 1990.
Rafé dorsal y medio	Serotonina	Inervación muy escasa al NPV	Larsen P.J., et al.,1996
Rafé magno	???	Inervación densa al parvo ap, dp y lp Inervación escasa a magno posterior	Larsen P.J., et al.,1996
Tallo cerebral : - Locus coeruleus - A2 en complejo vago dorsal - A1 en médula ventrolateral	noradrenalina	- Pv parvo - Pv, mp y dp - Todas las zonas magno	Palkovits, M., et al.,1980 Swanson, L.W., et al.,1980.
Tallo cerebral: núcleo del tracto solitario	Población parcialmente noradrenérgica	Todas las divisiones parvo	Ricardo, J.A. y Koh,E.T., 1978. Swanson, L.W. y Kuypers, H.G., 1980.
Núcleo perifornical del hipotálamo lateral	???	Inervación escasa a neuronas OXT magnocelulares	Larsen, P.J., et al.,1994.
Núcleo del lecho de la estria terminal, septo, algunos núcleos hipotalámicos, núcleo dorsal y medio del rafé	???	Neuronas OXT magnocelulares	Miselis, R.R., 1981. Lind, R.W., et al.,1982. Swanson, L.W., et al.,1987
Tallo cerebral, órgano subfornical, n. preóptico medio	NA (región A1 del T. cerebral)	Neuronas AVP magnocelulares	Cunningham, E.T. Jr. y Sawchenko, P.E., 1988.

EL SISTEMA TRHÉRGICO Y LA RESPUESTA AL FRÍO

Respuesta autónoma al frío

El sistema nervioso simpático participa en el control de la termoregulación aumentando por un lado, la termogénesis en células del tejido pardo adiposo (BAT) y la presión sanguínea y por el otro, disminuyendo el ritmo cardíaco y el consumo de oxígeno.

Las hormonas tiroideas desempeñan un papel importante en la adaptación asociada a cambios en la temperatura corporal y se han descrito acciones sinérgicas con las catecolaminas. El aumento de noradrenalina en respuesta al frío, correlaciona con un aumento en la conversión periférica de T4 a T3 [Storm, H. y col., 1981]. En general, las hormonas tiroideas controlan el metabolismo basal estimulando la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria en la mitocondria e induciendo cambios en el metabolismo basal que son persistentes. Las catecolaminas por su parte aumentan la producción de calor por encima del metabolismo basal estimulando la lipólisis y la glucólisis en respuesta a distintas demandas metabólicas. La exposición al frío aumenta la concentración de noradrenalina en el plasma y se ha descrito que este neurotransmisor se une a receptores α y β adrenérgicos de células BAT induciendo un aumento tanto en la velocidad metabólica como en la termogénesis del tejido pardo adiposo. La TRH sintetizada en el núcleo motor dorsal y el raquí caudal del tallo cerebral, también participa en la respuesta autónoma al frío [Dolan, D.H. y col., 1992].

Respuesta endócrina al frío

La exposición al frío produce un aumento rápido en la concentración de TSH circulante y de T3 (en minutos) dependiente del incremento en la liberación de la TRH de neuronas cuyos núcleos se localizan en el PVN. La expresión del gen de la TRH incrementa en distintas zonas hipotalámicas, incluidas las neuronas del PVN. En ratas macho expuestas a frío, la TRH se libera de la EM entre 30-45 min posterior al estímulo [Arancibia, S. y col., 1989] y el aumento en la expresión de su RNAm en el PVN ocurre 1 hr después de la estimulación, regresando al nivel basal a las 2 hrs de exposición a frío [Uribe, R.M. y col., 1993., Rage. y col., 1994]. La estimulación al frío por un período mayor (6hrs), también incrementa los niveles de RNAm de la TRH en el PVN y estos cambios ocurren tanto en la zona rostral como en la caudal del PVN [Zoeller, RT. y col., 1990]. Zoeller propuso que el frío aumenta el RNAm de la TRH en

la misma población que es regulada por T3 sin embargo, esta aseveración es polémica en el sentido de que la regulación negativa por T3 sólo ha sido demostrada para las neuronas parvocelulares de la zona media del PVN [Koller, K.J. y col., 1987., Zoeller, R.T. y col., 1988., Segerson, T.P. y col., 1987 (a), Dyess, E.M. y col., 1988]. La exposición a frío también activa el eje adrenal incrementando la expresión del RNAm de CRH en el PVN y la liberación de ACTH y GC periféricos [Zoeller, R.T. y col., 1995]. Recientemente se mapeó la respuesta al frío en el cerebro empleando a la proteína Fos [Baffi, JS. y Palkovits, M., 2000] y se encontró que su inmunoreactividad incrementa en el núcleo preóptico medio (que es considerado como el centro termoregulador del cerebro), sitios específicos en médula, parte dorsal del núcleo pontino, tálamo rostral y zona incerta. La amígdala central, núcleo del tracto solitario y núcleo arcuato también presentaron inmunoreactividad a Fos y, otros núcleos identificados previamente en la respuesta al frío expresaron Fos (núcleo dorsomedial, supramamilar y lateral parabranchial). En el PVN, las neuronas responsivas a frío mostraron patrones topográficos específicos en las zonas media y dorsal parvocelular (inmunoreactividad moderada); Fos no se detectó en las zonas magno y parvocelulares restantes. Estos datos sugieren que además de la respuesta del eje adrenal y tiroideo al frío, otros sistemas que responden al estrés podrían participar de forma importante en el mantenimiento de la homeostasis durante la exposición al frío.

Interacción autónoma y endócrina en el frío

Además de la respuesta endócrina del PVN al frío, hay proyecciones directas del PVN al sistema nervioso autónomo que transmiten la información hacia blancos periféricos implicados en la termogénesis a través del complejo vago dorsal y la médula espinal [Sawchenko, P.E., y Swanson, L.W., 1981]. De hecho, la estimulación farmacológica del PVN por aplicación local de glutamato, aumenta la producción de calor en células BAT y la temperatura del cuerpo a través del sistema nervioso autónomo [Amir, S., 1990]. El núcleo del rafe también está implicado en la transmisión de la información térmica de la piel al tálamo e hipotálamo [Necker, R. y col., 1986] y se sabe que existen conexiones recíprocas entre el tallo cerebral y el PVN [Swanson, L.W. y Kuypers, H.G., 1980]. La **figura 3** muestra un diagrama

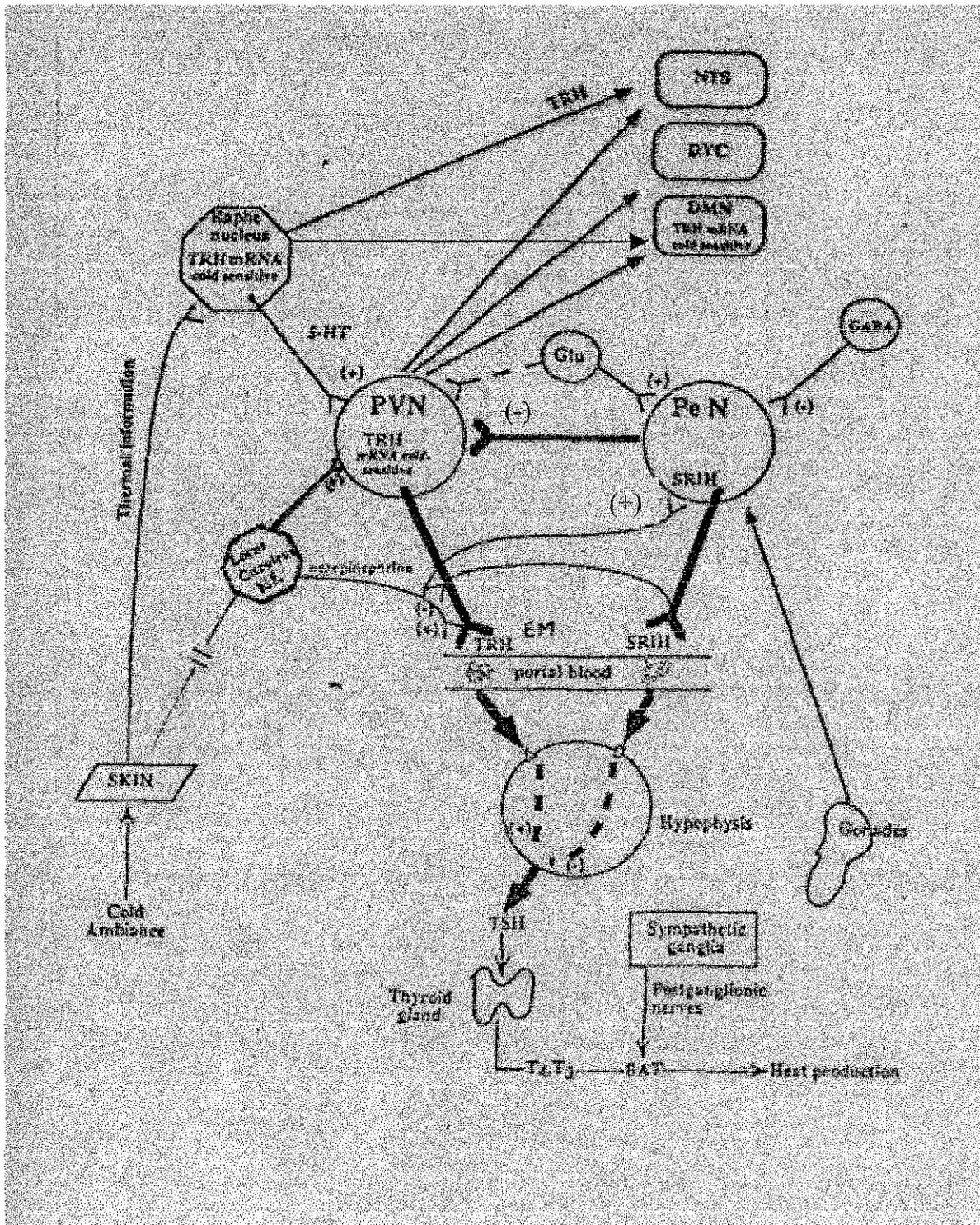


Figura 3. Integración de la respuesta al frío. El esquema muestra las interacciones entre los sistemas autónomo y endócrino que participan en la respuesta al frío. NTS: núcleo del tracto solitario, DVC: complejo vago dorsal, DMN: núcleo dorsomedial, PVN: núcleo paraventricular, Pe N: núcleo periventricular, TRH: hormona liberadora de tirotrópina, SRIF: somatostatina, NE: norepinefrina, TSH: tirotrópina, T3, T4: hormonas tiroideas, BAT: tejido pardo adiposo. (Modificado de Arancibia, S., et al., 1989).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en donde se integran los distintos sistemas que intervienen en la respuesta al frío. La complejidad de las interacciones entre ambos sistemas es aún materia de investigación.

FISIOLOGIA DE LA LACTANCIA

La lactancia es un fenómeno neuroendócrino complejo que inicia con la estimulación tanto física (succión) como esteroceptiva de las crías recién nacidas hacia las madres. Este estado se caracteriza por un aumento en la demanda energética de la madre, que se atribuye en parte a la producción de leche. Dicha demanda es compensada con un aumento en el apetito varias veces mayor al de ratas no lactantes [Vernon, R.G. y Flint, D.J., 1983] y un incremento en la actividad del tracto gastrointestinal y del hígado [Widdowson, E.M., 1976].

Los elementos implicados entre el SNC, y las aferencias somatosensoriales que se activan en respuesta a la estimulación por succión, se conocen de forma parcial. En los roedores, la ruta aferente, seguida por la información sensorial en el pezón, involucra a los nervios sensoriales periféricos que entran a la médula espinal a través de la raíz dorsal y a varios relevos sinápticos en el cuerno dorsal antes de que la transmisión alcance la columna anterolateral. Estas vías contienen fibras destinadas a varios sitios en el tálamo, médula espinal y en particular a la formación reticular del tallo cerebral. Desde este punto, la ruta al hipotálamo no está bien identificada, pero eventualmente la información es llevada del cerebro medio anterior hasta el PVN magnocelular y el núcleo supraóptico (SON) del hipotálamo. La activación de neuronas magnocelulares lleva al aumento en la síntesis de oxitocina (OXT) y liberación de la hormona de la hipófisis posterior a la circulación. OXT llega a la glándula mamaria y provoca la contracción de las células mioepiteliales que rodean a los alveolos, forzando la liberación de la leche hacia los ductos; el aumento resultante en la presión intramamaria trae como consecuencia la bajada de la leche hacia el pezón y la remoción de la misma por la cría que succiona el pezón. La liberación de OXT del PVN y SON en respuesta a la succión, es dependiente de la activación de receptores α y β adrenérgicos presentes en neuronas magnocelulares de ambos núcleos [Bealer, S.L. Y Crowley, W.R., 1998].

En las hembras lactantes, la secreción de PRL se encuentra casi totalmente bajo el control de impulsos neurogénicos aferentes, generados por la succión de las crías o a partir de señales esteroceptivas asociadas a la succión [Grosvenor, C.E. y Whitworth, N., 1974]. La succión es

necesaria para el mantenimiento de la lactancia en la rata ya que si se interrumpe separando a las crías de sus madres, los niveles de PRL decaen rápidamente (3.5 hrs) a los observados en ratas vírgenes y paulatinamente, las hembras regresan al ciclo estral [Walker, CD. y col.,1992]. Por otro lado, la succión en hembras vírgenes, puede inducir el comportamiento materno y eventualmente la lactancia, que se desarrolla de igual manera al de una rata que ha tenido a sus crías. Durante la lactancia, la PRL no se secreta de forma tónica, sino fásica [Grosvenor, C.E. y col.,1981]; la estimulación del pezón induce el reflejo de liberación de PRL adenohipofisiaria y la cantidad liberada está determinada por la fuerza y duración de la estimulación del pezón así como del número de crías que succionen a la vez [van Haasteren, G.A.C. y col.,1996].

En condiciones basales, dopamina (DA) es el principal factor inhibidor de la secreción de PRL de los lactótrofos de la hipófisis anterior. Sin embargo, durante la lactancia se observa una supresión en la actividad de las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares del núcleo arcuato que trae como consecuencia una disminución en la secreción de DA a la sangre portal [Demarest, KT. y col., 1983., Wang, H.J. y col., 1993]; esta disminución permite que la PRL sea secretada a la circulación y transportada a los alveolos mamarios. PRL estimula la síntesis y secreción de las proteínas de la leche (caseína, lactoalbúmina y lactoglobulina) a través de la unión a su receptor en las células alveolares.

La concentración de estrógenos y progesterona circulantes, así como de lactógeno placentario, caen abruptamente después del parto; al parecer, los esteroides inhiben la secreción de la leche actuando directamente sobre el tejido mamario a nivel de las células alveolares. La caída en los niveles circulantes de estrógenos y de progesterona al momento del nacimiento [Nissenson, R. y col.,1978], también correlaciona con el aumento en el contenido de PRL hipofisiaria y secreción de la hormona a la glándula mamaria [Meites, J. y Nicoll, C.S., 1966]. Si bien los estrógenos y la progesterona participan en la reestructuración de los núcleos hipotalámicos implicados en esta condición fisiológica (modulando entre otras cosas la actividad eléctrica de las neuronas magnocelulares), estas hormonas no son suficientes para provocar cambios plásticos en dichos núcleos ya que la actividad magnocelular en el PVN o el SON se modifica cuando los animales se encuentran en pseudogestación y gestación [Amico,

J.A. y col., 1995]. Al parecer, la integración de las señales tanto hormonales como neurales es necesaria para el remodelamiento de los sistemas implicados en la lactancia.

Participación de la TRH en la liberación de PRL inducida por la succión

La succión induce aumentos rápidos en la PRL del plasma de hembras lactantes, que alcanza su máximo dentro de 15-30 min de estimulación [Blake, CA., 1974., Voogt, J.L. y Carr, L.A., 1974]. La TRH participa de manera importante en la regulación de la liberación de la PRL hipofisiaria inducida por la succión. Una inyección icv de la TRH aumenta la concentración de PRL en el plasma sólo cuando las crías succionan entre 15 y 30 minutos; la inmunoneutralización del péptido atenúa, aunque no bloquea totalmente, la liberación de PRL inducida por la succión [de Greef, W.J. y col., 1987]. En hembras succionadas, el aumento rápido en el contenido y liberación de la TRH de la eminencia media así como la disminución en los niveles de DA hipotalámica traen como resultado la liberación de PRL de la glándula mamaria [Grosvenor, C.E. y Mena, F., 1980., de Greef, W.J. y Visser, T.J., 1981]. El aumento en la liberación de la TRH también está acompañado por un incremento rápido y transitorio en los niveles del RNAm de la TRH del PVN, que alcanza un pico máximo a los 30 min; a los 60 min se recuperan los valores control [Uribe, R.M. y col., 1993., van Haasteren, G.A.C. y col., 1996]. En esta condición no se observan cambios en los niveles de TSH circulantes y se postula que la falta de respuesta de TSH a la TRH podría deberse a la presencia de otros factores en la circulación. OXT por ejemplo, atenúa la liberación de TSH inducida por la TRH en condiciones *in vitro* [Frawley, L.S. y col., 1985].

Activación neuronal por el estímulo de la succión

Patrones discretos de expresión de *c-fos* han sido observados en el cerebro de ratas lactantes después de recibir un estímulo agudo de succión al día 11 de la lactancia [Lin, SH. y col., 1998., Lonestein, J.S. y Stern, J.M., 1997., Numan, M. y Numan, M.J., 1994., Numan, M. y Numan, M.J., 1995]; el gen de *c-fos* se expresa en la parte dorsal y lateral del septo lateral, área preóptica media, área preóptica periventricular, núcleo supraóptico, médula ventrolateral, locus coeruleus, núcleo parabranchial lateral y núcleo paralemniscal.

La expresión de *c-fos* también ha sido determinada en el hipotálamo anterior, amígdala media, sustancia gris periacueductal y otras áreas del cerebro asociadas con la transmisión de estímulos sensoriales de las crías hacia las madres [Li, C. y col.,1999]. Si bien no hay una activación de *c-fos* en el PVN u otros núcleos hipotalámicos que participan de manera importante en mediar las respuestas a la estimulación por succión (como las neuronas de NPY en el núcleo arcuato), es posible que poblaciones de neuronas de las áreas mencionadas, releven información hacia estos núcleos para aumentar la actividad de neuronas implicadas en la respuesta a la succión.

Neurotransmisores implicados en mediar la respuesta a la succión

Adrenalina y noradrenalina

Durante el reflejo de eyección de la leche inducido por la succión, todas las neuronas oxitocinérgicas a través del hipotálamo despliegan una descarga de potenciales de acción de alta frecuencia que llevan a la liberación masiva de la hormona a la circulación y se presume que la respuesta está dada, al menos en parte, por el aumento en la liberación de noradrenalina de terminales sinápticas que contactan a las neuronas oxitocinérgicas en las zonas magnocelulares del PVN y SON, así como por la activación de receptores α y β adrenérgicos en el PVN [Bealer, S.L. y Crowley, W.R., 1998]. Además, la succión incrementa el recambio de noradrenalina en el PVN y SON de ratas lactantes apoyando con ello el aumento en la síntesis y/o liberación del NT en respuesta al estímulo fisiológico [Crowley, WR. y col., 1987].

Serotonina

La depleción de serotonina (5-HT) con inhibidores de su síntesis bloquea la liberación de PRL inducida por la succión en la rata lactante [Kordon, C. y col.,1973] y, los bloqueadores del receptor a 5-HT inhiben la liberación de PRL inducida por la succión [Gallo, RV. y col.,1975]. La distribución del sistema 5-HT en el SNC así como el efecto de deaferentación hipotalámica sobre los niveles de PRL sugiere fuertemente que los cuerpos de las neuronas serotoninérgicas implicadas en la liberación de PRL inducida por la succión, se originan fuera del hipotálamo [Clemens, J.A. y Shaar, C.J., 1980]. Ratas lactantes con lesiones del rafé dorsal o medio, que

reciben un estímulo agudo de succión por 30 min, muestran una disminución significativa en la liberación de PRL inducida por la succión así como una depleción del 65% en la 5-HT hipotalámica sólo en las ratas que fueron lesionadas en el rafe dorsal [Barofsky, AL. y col.,1983]. Si bien estos datos apoyan que el rafe dorsal envía aferencias serotoninérgicas estimuladoras al hipotálamo durante la succión, queda por definir la población celular sobre la cual se libera el neurotransmisor.

HISTAMINA

La succión aumenta de forma significativa la expresión del RNAm de la enzima que sintetiza la histamina (histamina descarboxilasa) en el núcleo tuberomamilar ventrolateral - el único sitio hipotalámico donde se sintetiza este NT- y se cree que el efecto podría ser directo sobre el PVN y SON porque se han detectado fibras histaminérgicas en ambos núcleos [Schwartz, JC. y col.,1991., Hough, LB., 1988]. La histamina activa la expresión de *c-fos* en neuronas de CRH, vasopresina (AVP) y OXT del PVN de machos adultos [Kjaer, A. y col., 1994 (a)] y, la activación de receptores a histamina aumenta tanto la concentración de CRH en sangre portal como la expresión de su RNAm en el PVN [Kjaer, A. y col., 1994 (b)] por tanto, es posible que el efecto de la histamina sobre la liberación de ACTH en la succión sea a través de la activación de las neuronas de CRH en el PVN. La activación de las neuronas histaminérgicas también está implicada en la mediación de las respuestas de OXT y PRL inducidas por la succión [Schagen, FHE., 1996]. Su acción debe ocurrir a nivel del hipotálamo porque no se ha observado un efecto directo a través de la hipófisis [Knigge, U., 1991].

RESPUESTA GENERAL AL ESTRÉS

Activación del eje adrenal

El cuerpo responde a distintos estímulos, que van desde alteraciones psicológicas (que producen ansiedad, miedo e ira) hasta alteraciones físicas (como exposición al frío, calor o trauma quirúrgico), liberando ACTH de la hipófisis anterior, GC de la corteza adrenal, adrenalina de la médula adrenal y noradrenalina del sistema nervioso simpático. Estas

ESTRÉS CON
FALSA DE ORIGEN

hormonas adaptan el cuerpo al estrés, modulando la actividad cardiovascular, la producción de energía y el sistema inmune.

Las células que sintetizan ACTH en la hipófisis son controladas por una población de neuronas parvocelulares del PVN hipotalámico que sintetizan y liberan CRH a la sangre portal. La unión de la hormona a su receptor en células hipofisarias, estimula tanto la síntesis como la liberación de ACTH. La ACTH secretada estimula la síntesis de corticosteroides en la corteza adrenal. La liberación de corticosteroides a la sangre periférica y su posterior internalización a las células blanco, alerta a los sistemas respectivos para que el organismo genere una respuesta inmediata hacia el estímulo.

Las neuronas de CRH responden a cambios en los niveles circulantes de corticosterona disminuyendo la expresión de su RNAm si se administra Dex ip o aumentando la expresión de su RNAm posterior a Adx [Jingami, H. y col.,1985]. La administración local de GC también reduce el RNAm de CRH sugiriendo que los receptores locales a GC en el PVN son responsables, al menos en parte, del efecto retroalimentador negativo. Algunas evidencias muestran que la regulación de la expresión del CRH además de ser hormonal, también es transináptica [Herman, J.P. y col.,1990]. *En condiciones normales* se producen cambios diurnos en la secreción de ACTH que se observan también en ausencia de corticosterona o durante cambios constantes en los niveles de esteroides sugiriendo con ello, que las neuronas de CRH en el PVN responden a regulación neural aferente. El hipocampo es una zona claramente implicada en la regulación extrahipotalámica retroalimentadora de GC; la destrucción de las aferencias del hipocampo al PVN incrementan la expresión del RNAm de CRH y del péptido en la sangre portal [Sapolsky, R.M. y col.,1989].

Los niveles del RNAm de CRH aumentan *en respuesta a estrés físico* (pinchar cola a roedores, administración ip de solución salina, administración de péptidos opiáceos) o *estrés psicológico* (nado forzado, inmovilización). Los cambios a nivel del RNAm de CRH ocurren de 120 a 180 min posterior al estímulo, a pesar de que el estrés incrementa rápidamente los niveles de corticosterona y ACTH en la sangre (desde los 15 minutos de estimulación). Dado que corticosterona regula de forma negativa al eje adrenal, se esperaría que el nivel de RNAm de CRH disminuyera en respuesta al estrés; sin embargo los niveles de RNAm de CRH aumentan en el PVN a pesar de que corticosterona esté aumentada en sangre. Lightman, S.L. y Young,

W.S., 1989, investigaron la relación entre los niveles de corticosterona y la amplitud de la respuesta de CRH a un estímulo dado y encontró que la respuesta de CRH al estrés no depende de los niveles de corticosterona en sangre; si bien la Adx incrementa de forma considerable el RNAm de CRH, persiste una respuesta significativa al estrés, similar a lo observado en las ratas control. Igualmente, si se administran corticoides exógenos, en dosis altas que suprimen el nivel basal de RNAm de CRH, se observa el incremento en la expresión de CRH en respuesta al estrés [Harbuz, M.S. y col.,1990]. Esto indica que la activación transináptica de las neuronas que sintetizan a CRH en el PVN es independiente de la presencia de receptores activados a GC.

Expresión de genes tempranos

La expresión de genes tempranos inmediatos (IEG's) en respuesta a estímulos distintos ha sido una herramienta ampliamente utilizada para mapear activación neuronal en sitios específicos del cerebro. Uno de los IEG's más empleados es el gen *c-fos* [Morgan, J., y Curran, T.,1989., 1991 (a)., Sagar, S. y col.,1988]. *c-fos* es un gen temprano que al ser traducido genera a la proteína Fos; esta proteína dimeriza con proteínas nucleares codificadas por miembros de la familia *c-jun* e interacciona con secuencias *cis-específicas* en el DNA de genes blanco conocidas como sitios AP-1 para regular su transcripción [Chiu, R. y col.,1988., Curran, T. y Franza, B.R., 1988., Morgan, J., y Curran, T., 1991]. La expresión de *c-fos* y de la proteína aumentan en respuesta a estrés agudo en varias regiones del cerebro, incluyendo corteza cerebral, hipocampo, amígdala [Matinez, M. y col.,1998], septo, área preóptica, hipotálamo [Cullinan, W.E. y col.,1995., Melia, K.R. y col.,1994] y tallo cerebral [Chen, X., y Herbert, J., 1995] y se atenúa en algunas de las áreas en respuesta a estrés repetido o crónico. Aunque la respuesta de *c-fos* al estrés es la más caracterizada, también se ha demostrado la activación de otros IEG's; la activación de éstos varía dependiendo del estímulo que se aplique. Algunos tipos de estrés agudo incrementan la expresión de *c-fos* y del factor de crecimiento nervioso tipo A (NGFIA o zif/268) en distintas áreas del cerebro mientras que el RNAm de *c-jun* es poco inducido [Cullinan, W.E. y col.,1995]. En el caso específico del estrés agudo por inmovilización, *c-fos* y *jun-b* aumentan significativamente mientras que, la inducción del RNAm de NGFIA, *c-jun* y *jun-d*, es moderada [Melia, K. R. y col., 1994]. Administración de

alcohol en ratas aumenta la expresión de *c-fos*, *jun-b* y *jun-d* en el hipocampo [Ryabinin, A.E. y col.,1995]. En resumen, el mapeo de distintos IEG's parece ser necesario para la caracterización de las respuestas al estrés.

Respuesta al estrés en la lactancia

La lactancia en mamíferos, está acompañada por una disminución considerable de la respuesta al estrés que en parte se atribuye a una reducción del tono noradrenérgico a nivel de las neuronas CRHérgicas del PVN [Toufexis, D.J. y Walker, C.D.,1996]. La liberación endógena de noradrenalina del PVN es menor en ratas lactantes en condiciones basales que en vírgenes y tanto la densidad como la afinidad de los receptores α -2 noradrenérgicos disminuye en función de la lactancia (menor hasta un 40% entre los días 10-20). La densidad del receptor α -1 incrementa pero no su afinidad y, la expresión del RNAm del receptor α -1D disminuye al día 10 comparado con las hembras vírgenes [Toufexis, D.J. y col., 1998]. Es posible que durante la lactancia, la sensibilidad de las neuronas noradrenérgicas al estrés, se vea afectada por cambios plásticos que ocurren durante esta condición fisiológica.

En condiciones basales, la expresión del RNAm de CRH en el PVN parvocelular, se encuentra disminuída en ratas lactantes [Windle, R.J. y col., 1997]. Mientras que la administración icv del péptido en ratas vírgenes, induce la expresión del RNAm de *c-fos* y NGF1-B en el PVN y otros núcleos hipotalámicos así como en el hipocampo, el gen *c-fos* sólo se expresa en el hipocampo de ratas lactantes y NGF1-B no se activa [Da costa, A.P.C. y col., 1997]. Esto podría implicar cambios en los mecanismos aferentes al PVN, que son mediados por CRH en respuesta al estrés en la condición de lactancia. La administración icv de CRH en ratas a mitad de la lactancia, disminuye la cantidad de leche secretada dependiendo de la dosis inyectada del péptido [Almeida, OF., 1994] lo cual explica en parte la disminución general de la expresión del RNAm de CRH durante esta condición fisiológica.

La exposición a estrés por éter, formalina o inmovilización trae como consecuencia un aumento de corticosterona en sangre (es decir, las ratas responden al estrés) y disminución de PRL circulante en ratas lactantes a las que se les ha retirado a sus crías por un período de tiempo determinado. Sin embargo, si las crías se regresan para que succionen durante 30 min ya no se observan cambios en respuesta a ningún estrés aplicado [Banky, Z. y col.,1994] o

bien el incremento de distintas hormonas en el suero (PRL, ACTH y corticosterona), es de menor magnitud si se compara con el incremento en ratas vírgenes [Walker, CD. y col.,1992]. Las ratas lactantes responden al estrés de forma similar a las hembras vírgenes sólo cuando se les ha retirado a sus crías por 48 hrs, cuando ya están regresando al ciclo estral. Es posible que cambios en las aferencias sinápticas necesarios para el funcionamiento adecuado del organismo durante la lactancia, eviten la estimulación neuronal que normalmente es activada por el estrés.

JUSTIFICACIÓN

En respuesta a la estimulación aguda como el frío en ratas macho, o la succión en hembras lactantes, se observan cambios en los niveles de expresión del RNAm de la TRH en las neuronas del PVN que correlacionan con incrementos en los niveles circulantes de TSH o de PRL, y que a la vez son un reflejo de activación del eje hipotálamo-hipofisario. Estos cambios se atribuyen en parte a la activación de mecanismos transinápticos que inciden sobre las neuronas TRHérgicas del PVN [Uribe, R.M. y col., 1993].

Varias evidencias experimentales han conducido a la hipótesis de que la exposición aguda al frío activa a las neuronas TRHérgicas del PVN a través de aferencias adrenérgicas provenientes del tallo cerebral [Annunziato, y col.,1977., Arancibia, S. y col.,1983., Shioda, S. y Nakai, Y., 1993] mientras que en el caso de la succión el mecanismo parece ser más complejo y no hay evidencias directas de activación transináptica sobre las neuronas TRHérgicas del PVN bajo esta condición. Se cree que la activación de neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral es necesaria para provocar la respuesta celular al estímulo pero la ruta ascendente al hipotálamo y en particular al PVN aún es materia de controversia [Barofski, AL. y col.,1983., Larsen, PJ. y col.,1996., Baffi, JS. y Palkovits, M., 2000]. El sistema se torna aún más complejo si tomamos en cuenta que las neuronas TRHérgicas son innervadas de forma diferencial dependiendo de la región parvocelular en la que se localicen. Es importante por tanto, entender los mecanismos por los cuales el frío, o la succión, activan a las neuronas TRHérgicas para regular su síntesis en respuesta a estimulación neural.

Dado que la respuesta al frío o a la succión se da a tiempos distintos en machos adultos y hembras lactantes respectivamente, es necesario conocer si las mismas neuronas TRHérgicas

bien el incremento de distintas hormonas en el suero (PRL, ACTH y corticosterona), es de menor magnitud si se compara con el incremento en ratas vírgenes [Walker, CD. y col.,1992]. Las ratas lactantes responden al estrés de forma similar a las hembras vírgenes sólo cuando se les ha retirado a sus crías por 48 hrs, cuando ya están regresando al ciclo estral. Es posible que cambios en las aferencias sinápticas necesarios para el funcionamiento adecuado del organismo durante la lactancia, eviten la estimulación neuronal que normalmente es activada por el estrés.

JUSTIFICACIÓN

En respuesta a la estimulación aguda como el frío en ratas macho, o la succión en hembras lactantes, se observan cambios en los niveles de expresión del RNAm de la TRH en las neuronas del PVN que correlacionan con incrementos en los niveles circulantes de TSH o de PRL, y que a la vez son un reflejo de activación del eje hipotálamo-hipofisario. Estos cambios se atribuyen en parte a la activación de mecanismos transinápticos que inciden sobre las neuronas TRHérgicas del PVN [Uribe, R.M. y col., 1993].

Varias evidencias experimentales han conducido a la hipótesis de que la exposición aguda al frío activa a las neuronas TRHérgicas del PVN a través de aferencias adrenérgicas provenientes del tallo cerebral [Annunziato, y col.,1977., Arancibia, S. y col.,1983., Shioda, S. y Nakai, Y., 1993] mientras que en el caso de la succión el mecanismo parece ser más complejo y no hay evidencias directas de activación transináptica sobre las neuronas TRHérgicas del PVN bajo esta condición. Se cree que la activación de neuronas serotoninérgicas del tallo cerebral es necesaria para provocar la respuesta celular al estímulo pero la ruta ascendente al hipotálamo y en particular al PVN aún es materia de controversia [Barofski, AL. y col.,1983., Larsen, PJ. y col.,1996., Baffi, JS. y Palkovits, M., 2000]. El sistema se torna aún más complejo si tomamos en cuenta que las neuronas TRHérgicas son innervadas de forma diferencial dependiendo de la región parvocelular en la que se localicen. Es importante por tanto, entender los mecanismos por los cuales el frío, o la succión, activan a las neuronas TRHérgicas para regular su síntesis en respuesta a estimulación neural.

Dado que la respuesta al frío o a la succión se da a tiempos distintos en machos adultos y hembras lactantes respectivamente, es necesario conocer si las mismas neuronas TRHérgicas

del PVN responden tanto al frío como a la succión o si existen subgrupos de neuronas que responden de manera independiente a cada uno de los estímulos.

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar si existen poblaciones de células TRHérgicas en el PVN que respondan de manera diferencial a los estímulos de frío y de succión.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en analizar la respuesta a los estímulos de frío y de succión en el mismo animal empleando como modelo experimental a la rata lactante.

Para ello analizamos la distribución de las neuronas TRHérgicas en el PVN de ratas lactantes sometidas a estimulación por frío y/o por succión, así como la expresión del gen temprano *c-fos* y del factor CREBP fosforilado para tratar de identificar marcadores de la respuesta celular al estímulo de frío y/o de la succión. En general se tomaron cortes de tejido alternos desde la zona rostral hasta la caudal del núcleo y se analizaron por hibridación *in situ* (HIS) para detectar al RNAm de la TRH o bien al RNAm de la TRH y de *c-fos* (doble HIS) o a la proteína CREBP por inmunohistoquímica. La señal para el RNAm de la TRH se cuantificó por microscopía de campo oscuro en toda la rebanada o bien dividiendo la señal en el PVN en celdas verticales que van del tercer ventrículo a la zona magnocelular. Las hibridaciones dobles con *c-fos* se analizaron por microscopía de campo claro tomando como referencia las células positivas al RNAm de la TRH y dentro de éstas las que colocalizaran con *c-fos*.

Dado que todos los estudios de exposición al frío se han realizado en ratas macho adultas, fue necesario comparar primero la respuesta al frío entre lactantes y machos o hembras vírgenes.

del PVN responden tanto al frío como a la succión o si existen subgrupos de neuronas que responden de manera independiente a cada uno de los estímulos.

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar si existen poblaciones de células TRHérgicas en el PVN que respondan de manera diferencial a los estímulos de frío y de succión.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en analizar la respuesta a los estímulos de frío y de succión en el mismo animal empleando como modelo experimental a la rata lactante.

Para ello analizamos la distribución de las neuronas TRHérgicas en el PVN de ratas lactantes sometidas a estimulación por frío y/o por succión, así como la expresión del gen temprano *c-fos* y del factor CREBP fosforilado para tratar de identificar marcadores de la respuesta celular al estímulo de frío y/o de la succión. En general se tomaron cortes de tejido alternos desde la zona rostral hasta la caudal del núcleo y se analizaron por hibridación *in situ* (HIS) para detectar al RNAm de la TRH o bien al RNAm de la TRH y de *c-fos* (doble HIS) o a la proteína CREBP por inmunohistoquímica. La señal para el RNAm de la TRH se cuantificó por microscopía de campo oscuro en toda la rebanada o bien dividiendo la señal en el PVN en celdas verticales que van del tercer ventrículo a la zona magnocelular. Las hibridaciones dobles con *c-fos* se analizaron por microscopía de campo claro tomando como referencia las células positivas al RNAm de la TRH y dentro de éstas las que colocalizaran con *c-fos*.

Dado que todos los estudios de exposición al frío se han realizado en ratas macho adultas, fue necesario comparar primero la respuesta al frío entre lactantes y machos o hembras vírgenes.

del PVN responden tanto al frío como a la succión o si existen subgrupos de neuronas que responden de manera independiente a cada uno de los estímulos.

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar si existen poblaciones de células TRHérgicas en el PVN que respondan de manera diferencial a los estímulos de frío y de succión.

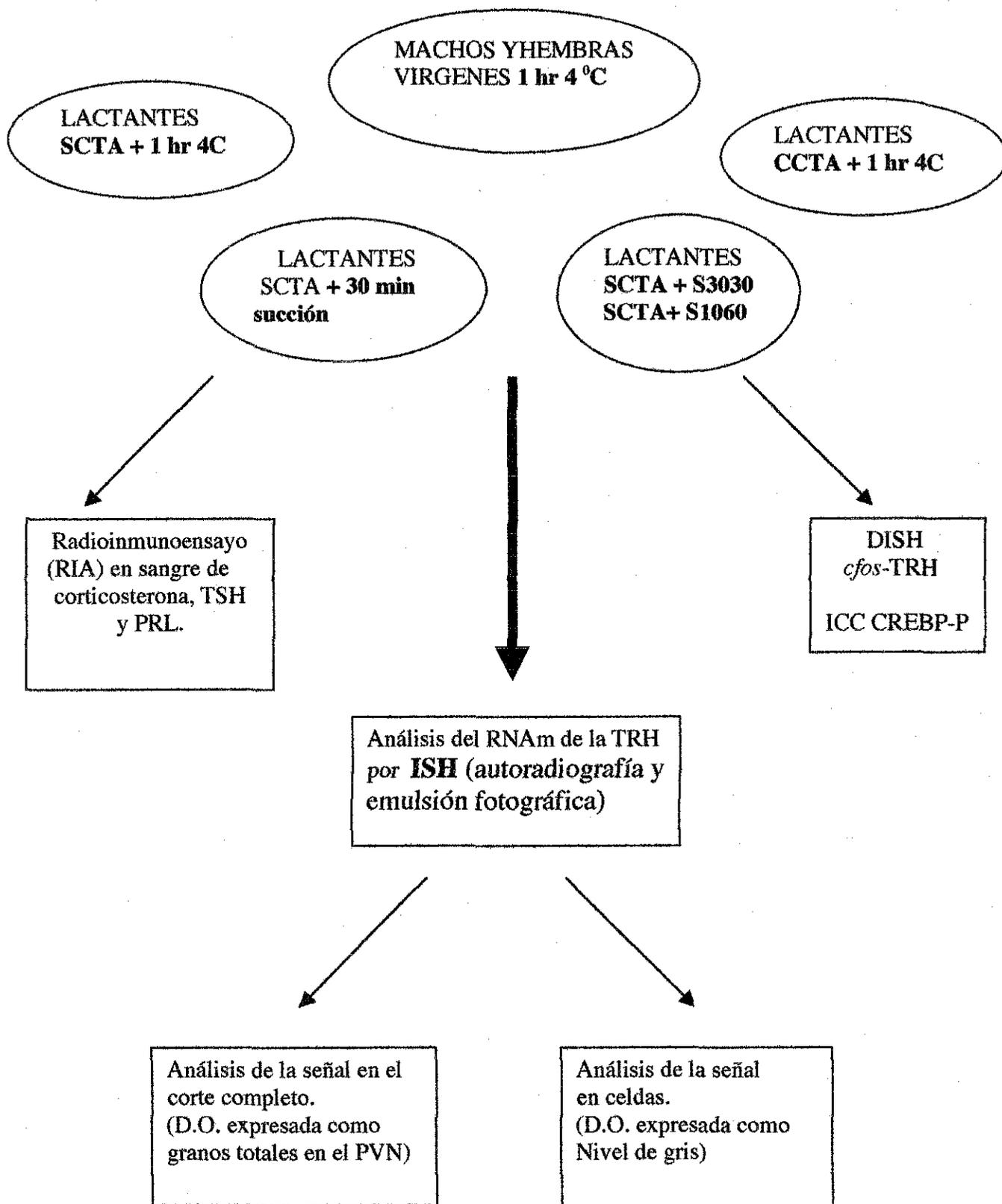
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental consistió en analizar la respuesta a los estímulos de frío y de succión en el mismo animal empleando como modelo experimental a la rata lactante.

Para ello analizamos la distribución de las neuronas TRHérgicas en el PVN de ratas lactantes sometidas a estimulación por frío y/o por succión, así como la expresión del gen temprano *c-fos* y del factor CREBP fosforilado para tratar de identificar marcadores de la respuesta celular al estímulo de frío y/o de la succión. En general se tomaron cortes de tejido alternos desde la zona rostral hasta la caudal del núcleo y se analizaron por hibridación *in situ* (HIS) para detectar al RNAm de la TRH o bien al RNAm de la TRH y de *c-fos* (doble HIS) o a la proteína CREBP por inmunohistoquímica. La señal para el RNAm de la TRH se cuantificó por microscopía de campo oscuro en toda la rebanada o bien dividiendo la señal en el PVN en celdas verticales que van del tercer ventrículo a la zona magnocelular. Las hibridaciones dobles con *c-fos* se analizaron por microscopía de campo claro tomando como referencia las células positivas al RNAm de la TRH y dentro de éstas las que colocalizaran con *c-fos*.

Dado que todos los estudios de exposición al frío se han realizado en ratas macho adultas, fue necesario comparar primero la respuesta al frío entre lactantes y machos o hembras vírgenes.

MATERIALES Y MÉTODOS



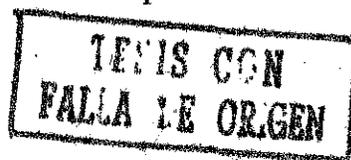
1. Animales

Los experimentos de 1 hr de frío se realizaron empleando ratas machos adultas de 300 g de peso promedio y hembras vírgenes de 250 g de la cepa Wistar. Los animales se retiraron del bioterio el día del experimento a las 7 am, 4 ratas / caja y se colocaron en un cuarto frío (4 ± 1 °C) o bien en un cuarto contiguo a temperatura ambiente (T.A) para ser sacrificados por decapitación entre las 9 y 10 am.

Para los experimentos de estimulación por frío y/o succión, se emplearon ratas hembras primíparas de la cepa Wistar a mitad de la lactancia (días 12 a 14 tomando como día 1 la fecha de parto). Las ratas fueron mantenidas en cajas individuales y manipuladas por el mismo experimentador desde el inicio de la gestación hasta el día del experimento para minimizar el estrés; la camada se ajustó a 8 crías desde el nacimiento. El día del experimento, se separaron a las ratas en 7 grupos alrededor de las 7 am y se sacrificaron a partir de las 3 pm como se describe a continuación: Grupo 1: Hembras lactantes mantenidas sin crías a T.A por 8 hrs (SCTA= tiempo cero de succión), Grupo 2: SCTA + 30 min de succión, Grupo 3: SCTA + 1 hr a 4 °C, Grupo 4: SCTA + 10 min de succión seguido por 1 hr a 4 °C, Grupo 5: SCTA + 30 min de succión seguido por 30 min a 4 °C, Grupo 6: Hembras lactantes mantenidas con sus crías por 8 hrs (CCTA= lactancia continúa), Grupo 7: CCTA + 1 hr a 4 °C (los grupos 6 y 7 se sacrificaron en día distinto a los grupos del 1-5). Los cerebros de todas las ratas fueron extraídos y congelados rápidamente en hielo seco; posteriormente se guardaron a -70 °C cubiertos con parafilm y papel aluminio hasta su uso. Los cortes de tejido se hicieron con un criostato a 12 micras de grosor, se montaron en portaobjetos cargados electrostáticamente (cat. No.12-550-15 de Fisher Scientific) y se almacenaron a -70 °C previo a los ensayos de ISH. El diagrama de la página anterior describe de manera general la metodología empleada para este estudio.

2. Cuantificación hormonal

Se colectó sangre del tronco de los animales experimentales posterior al sacrificio. Las muestras se centrifugaron a temperatura ambiente y posteriormente se prepararon alícuotas del suero de cada animal. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. El análisis hormonal se hizo por radioinmunoensayo empleando un kit de ICN para medir Corticosterona.



La medición de TSH y PRL se realizó con reactivos proporcionados por el NIDDK (National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases). El coeficiente de variación intra e inter ensayo fue menor al 10%. Se descartaron a los animales que no presentaron respuesta a TSH o PRL según el grupo experimental (siempre menor al 5-10% de los animales).

3. Material

Todo el material de vidrio que se empleó para la preparación y almacenamiento de las soluciones se horneó a 180 °C durante 12 hrs. El material de vidrio sensible a las altas temperaturas y el de plástico, se esterilizó en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 min.

El agua empleada para preparar las soluciones o para resuspender las sondas de cRNA o DNA(oligos) se desionizó (milliQ Plus, calidad: 18MΩ/cm) y colectó en frascos horneados; adicionalmente se esterilizó en una autoclave a 120 lb de presión durante 30 min.

4. Marcado de sondas

La metodología descrita a partir de esta sección ha sido referida con anterioridad en Sánchez,E. y col., 1997 (artículo anexo). En ese artículo se cita a los autores originales para cada una de las metodologías empleadas y las modificaciones hechas a las técnicas.

4. 1 Oligonucleótido de laTRH marcado con α -dATP [35 S]

Se empleó un oligonucleótido sintético de 50 bases que corresponde a las bases 317 - 367 del cDNA de la TRH de la rata [Lechan, RM. y col.,1986 (a)]. El oligo se marcó en el extremo 3' (con un kit de Boehringer) utilizando 1.5 μ l de deoxiribonucleotidil terminal transferasa (25 U/ μ l), buffer para la enzima a una concentración final de 1X (Buffer 5x = cacodilato de potasio 1M, Tris HCl 125 mM pH 6.6, albúmina de bovino 1.25 mg/ml), CoCl₂ 1.5 mM, 30 μ Ci de α -dATP [35 S], 2 picomolas de DNA y agua bidestilada y esterilizada para un volumen final de 15 μ l. La mezcla de reacción se incubó durante 30' a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó 1 μ l de la mezcla de reacción para medir el porcentaje de incorporación del α - dATP [35 S] en el oligonucleótido.

El resto de la reacción se precipitó a -70°C con $2\ \mu\text{l}$ de tRNA 10 mg/ml como coprecipitante, $1\ \mu\text{l}$ de EDTA 0.5 M, $1.5\ \mu\text{l}$ de NaOAc 3 M pH 7.0 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hora. Se centrifugó a 4°C y 15000 rpm durante 30 min (Centrifuga refrigerada de mesa MR18-22 marca Jouan, rotor de ángulo abierto de 60 mm) y posteriormente se decantó con cuidado (se aspiró el sobrenadante poniendo la punta de la pipeta por una de las paredes del tubo); la pastilla se secó a temperatura ambiente y después se resuspendió en $45\ \mu\text{l}$ de Tris 0.01 M-EDTA 0.001 M (TE) y $5\ \mu\text{l}$ de ditioneitol (DTT) 0.1 M. Se resuspendió y se tomó $1\ \mu\text{l}$ por duplicado para determinar las cpm's totales y la actividad específica de la sonda.

Adicionalmente se analizó una alícuota del oligo marcado por electroforesis en gel de acrilamida al 20%- 8M urea, TBE 1X con la finalidad de verificar que no estuviera degradado o contaminado con marca no incorporada. La electroforesis se corrió a 350 voltios durante 45 min en buffer TBE 1X y posteriormente el gel se envolvió en papel adherente, se colocó en un caset de exposición con un film kodak T-Mat y se expuso durante 3 hrs a T.A.

4. 2 Transcripción *in vitro* para el cRNA antisentido de *cfos* utilizando α - UTP [^{35}S]

Para llevar a cabo la transcripción *in vitro* del cRNA de *cfos*, se utilizó un fragmento de 531 pb del cDNA de la rata (bases 134 a 665) [Curran, T. y col.,1987]. Se empleó una mezcla equivalente a 35 pmolas de UTP frío y 100 pmolas de α - UTP [^{35}S]; el nucleótido marcado se colocó en un tubo eppendorf siliconizado o bien, esterilizado y se secó durante 15 minutos en un liofilizador (Savant); posteriormente se adicionaron los reactivos en el orden siguiente (reactivos de Boehringer): $1\ \mu\text{l}$ de buffer de transcripción 10X (THCl 0.4 M pH 8.0, MgCl_2 60 mM, DTT 100 mM, espermidina 20 mM), $1\ \mu\text{l}$ de DTT 100 mM disuelto en agua (recién preparado), $1.5\ \mu\text{l}$ de la mezcla de NTP's (A,G y C 10 mM), $1\ \mu\text{g}$ de DNA del plásmido *cfos* linearizado con Hind III y previamente desnaturalizado a 65°C durante 5', $1\ \mu\text{l}$ de RNAsin (40 U/ μl), $1\ \mu\text{l}$ de RNA polimerasa T7 (20 U/ μl) y H_2O para un volumen final de $10\ \mu\text{l}$. La mezcla de reacción se incubó durante 1 hr a 37°C . Transcurrido este tiempo se adicionó $1\ \mu\text{l}$ más de RNA polimerasa T7 y se incubó nuevamente por 1 hora. Posteriormente se adicionó $1\ \mu\text{l}$ de tRNA (10 mg/ml), $1\ \mu\text{l}$ de RNAsin (40 U/ μl) y $0.5\ \mu\text{l}$ de DNAsa I (10 U/ μl), se mezcló suavemente y se incubó nuevamente a 37°C durante 45 min. Para precipitar el transcrito se adicionaron $36.5\ \mu\text{l}$ de la solución para parar la reacción (NaOAc 0.6 M pH 4.0, EDTA 10

mM y SDS al 1%). En ese momento se tomó una alícuota de 1 μ l para determinar la eficiencia de incorporación del nucleótido [35 S].

A continuación se hizo una extracción (1:1) con 50 μ l de fenol y 50 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 5 minutos a 7000 rpm a T.A; se colectó el sobrenadante y se hizo una extracción más con 50 μ l de cloroformo: alcohol isoamílico, se agitó suavemente invirtiendo el tubo y se centrifugó por 5 min a 7000 rpm a T.A. Se colectó el sobrenadante y se hizo una primera precipitación con 0.3 M de NaOAc pH 4.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto durante una hora a -70 °C. Se centrifugó durante 30 min a 15000 rpm a 4 °C, se decantó con cuidado (de preferencia quitando el sobrenadante con una micropipeta por la pared del tubo opuesta al pellet) y se dejó secando a T.A por un tiempo aproximado de 10 minutos. La pastilla se resuspendió en 45 μ l de H₂O tratada con dietil pirocarbonato al 0.1 % (H₂O -DPC) y 5 μ l de DTT 0.1 M; se precipitó nuevamente con 0.3 M de NaOAc pH 4.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hr a -70 °C.

Transcurrido este tiempo se centrifugó a 15000 rpm por 30 min a 4 °C, se decantó el sobrenadante con cuidado y se secó la pastilla durante un tiempo aproximado de 20 minutos. Finalmente la pastilla se resuspendió en 45 μ l de H₂O -DPC, 0.2% SDS y 5 μ l de DTT 0.1 M mezclando bien; se tomó una alícuota de 1 μ l por duplicado para determinar la actividad específica de la sonda y otro μ l para verificar la integridad y longitud del transcrito por electroforesis en gel; el resto se congeló a -70 °C hasta su uso.

El μ l de la reacción se diluyó en H₂O -DPC para tener medio millón de cuentas totales por cada 5 μ l; la alícuota resultante se mezcló con 5 μ l de "stop mix" de secuencia (100% formamida, 0.25% xilen cianol, 0.25% azul de bromofenol) y se corrió en un gel en condiciones desnaturalizantes (acrilamida al 7%-8M urea, TBE 1X) junto con un marcador de peso molecular (RNA lader 0.155-1.77 kb) durante 45 min a 350 volts. Al término de la electroforesis, se separó el carril del marcador y se tiñó 1 min con bromuro de etidio; el resto del gel se envolvió en papel adherente y se expuso a un film kodak T-Mat durante 1 hr a T.A. El tamaño del transcrito se verificó al comparar la señal en el film con el marcador de peso molecular.

4. 3 Transcripción *in vitro* para el cRNA antisentido de la TRH empleando UTP Digoxigenina (UTP-Dig)

El procedimiento a seguir para transcribir cRNAs con digoxigenina (Dig) fue similar al descrito con radiactividad a excepción del paso de extracción con fenol-cloroformo que en este caso se omite.

En un tubo de microcentrífuga se adicionó 1 μ g del plásmido pSPT19 que contiene un fragmento de 700 pb del cDNA de la TRH de la rata [Lechan, RM. y col., 1986 (a)] linearizado con Eco R1 para transcribir la cadena antisentido y desnaturalizado a 65 °C por 5 minutos, 2 μ l de buffer de transcripción 10X, 1 μ l de DTT 100 mM recién preparado, 3 μ l de la mezcla de NTP's (A, G y C 10 mM), 4 μ l de UTP 1 mM, 2 μ l de UTP-Dig 10mM, 0.5 μ l de RNAsin (40 U/ μ l), 1.5 μ l de RNA polimerasa T7 (20 U/ μ l) y H₂O para un volúmen final de 20 μ l. La mezcla de reacción se incubó por 1 hr a 37 °C; transcurrido este tiempo, se adicionó 1.5 μ l más de polimerasa T7 y se incubó nuevamente a 37 °C por 1 hr. Para degradar al DNA templado, se adicionó 1 μ l de DNasa I (10 U/ μ l), 0.5 μ l de RNAsin (40 U/ μ l) y 0.5 μ l de tRNA 10 mg/ml; se mezcló suavemente y se incubó durante 45 minutos a 37 °C. Posteriormente, el volúmen se ajustó a 100 μ l adicionando 76.5 μ l de DTT 20mM (concentración final 15 mM). El cRNA se precipitó adicionando 0.3 M de NaOAc pH 4.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hr a -70 °C. Al término de la precipitación, se centrifugó a 15000 rpm durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante se decantó (con una micropipeta, por una de las paredes del tubo), se secó a T.A por 20 min y se resuspendió en 50 μ l de H₂O-DPC; se precipitó nuevamente con 0.3 M de NaOAc pH 4.0 y 3 volúmenes de etanol absoluto durante 1 hr a -70 °C, se centrifugó a 15000 rpm por 30 min a 4 °C, el sobrenadante se decantó con cuidado y la pastilla se secó durante un tiempo aproximado de 20 minutos. Finalmente se resuspendió la pastilla en 50 μ l de H₂O -DPC, 0.2% SDS.

La incorporación del UTP-Dig al transcrito se verificó por transferencia del RNA a una membrana y posterior detección del color con Ab-dig fosfatasa alcalina.

4.3.1 Hidrólisis del cRNA de la TRH-dig

Se llevó a cabo la hidrólisis alcalina del cRNA de la TRH-dig con la finalidad de facilitar la penetración del transcrito al tejido. Los pasos a seguir se refieren en volúmen y no en μ l

porque la cantidad de sonda marcada que queda después de verificar la integridad del transcrito en la membrana puede variar.

Para obtener fragmentos de 150 pb en promedio, se adicionó un volúmen de H₂O y 2 volúmenes de buffer de carbonatos (Na₂CO₃ 0.06 M, NaHCO₃ 0.04 M pH 10.2) al tubo que contuvo el cRNA de la TRH sintetizado con Dig; la hidrólisis se realizó a 60 °C durante 40 minutos. Para detener la reacción se adicionó un volúmen de buffer de neutralización (NaOAc 0.2 M pH 6.0, 1 % ácido acético) y 5 µl de DNase 10 mg/ml con 3 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar al transcrito durante 1 hr a -70 °C. Luego se centrifugó a 15 000 rpm a 4 °C por 30 min, se decantó el sobrenadante y se adicionaron 100 µl de etanol al 70 %. Se centrifugó a 15 000 rpm a 4 °C por 5 min, se decantó el sobrenadante y se secó el transcrito a T.A durante 15 min. La muestra se resuspendió en 100 µl de H₂O-DPC-0.2%SDS durante 10 min a 37 °C con agitación constante. Se tomó una alícuota de 3 µl para verificar el tamaño del transcrito hidrolizado con Ab-dig fosfatasa alcalina (PA) sobre una membrana.

Dado que los transcritos con Dig son muy estables cuando se almacenan a bajas temperaturas, se hicieron varias reacciones a la vez y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

4.3.2 Detección del cRNA de la TRH-dig en membrana

Se colocó una muestra del transcrito hidrolizado, y una del transcrito completo (como control negativo de la hidrólisis) en un gel de acrilamida-bis acrilamida al 6%-TBE 1X. A la par se colocaron cantidades conocidas de un RNA estándar de Boehringer sintetizado con dig, para saber la concentración del transcrito y también como control positivo de la reacción de color con PA. Todas las muestras se desnaturalizaron previamente por 5 min a 65 °C.

La electroforesis se realizó a 300 voltios durante 1 hr; posteriormente se llevó a cabo la transferencia de las muestras a la membrana en un "semidry blotting" colocando 3 papeles watman 3 mm sobre la superficie del semidry, solución Anodo 1 suficiente para cubrir el papel, otros 3 papeles watman y solución Anodo 2 suficiente, la membrana de nylon previamente humedecida por 5 min en metanol y 5 min más en solución cátodo, el gel con las muestras hacia la membrana, y finalmente 6 papeles watman humedecidos en solución cátodo. La transferencia de las muestras se llevó a cabo por 45 min a 45 mAmpereos. Al cabo de este

tiempo se fijaron las muestras a la membrana con luz U.V (Stratalinker a 1200 Jouls con 3 "autocross" de 1 min c/u).

La membrana se humedeció 5 min en buffer B (Tris HCl 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM) y luego se incubó 5 min con bloqueador de Boehringer (Cat. No. 1096176) disuelto en PBS 1X, pH 7.5 y 5 min con Ab dig PA (1:5000); posteriormente se enjuagó en buffer B por 5 min. La detección del color se llevó a cabo con poca luz porque los reactivos son fotosensibles. Se utilizaron 45 µl de NBT (cloruro de nitroazul de tetrazolio 75 mg/ml) y 35 µl de x-fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato, 4-toluidina 50 mg/ml) por cada 10 ml de solución B. La aparición del color se detectó desde los 5 min y la reacción se detuvo con buffer B a los 15 min.

5. Hibridaciones *in situ* (HIS)

5. 1 Preparación de los tejidos

Los cortes de cerebro almacenados a -70 °C se descongelaron con una secadora de mano a calor suave, a una distancia aproximada de 1 metro y se trataron de la manera siguiente:

Fijación de los tejidos por 10 min en paraformaldehído al 4%- PBS 1X (PBS 10X = NaCl 1.36 M, KH₂PO₄ 14.7 mM, Na₂HPO₄ 80 mM, KCl 26.8 mM)

2 lavados de 5 min c/u en PBS 1X

Un paso de acetilación por 10 min en SSC 4x (SSC 20x= NaCl 3 M, NaCl 0.3 M, pH 7.0), anhídrido acético 0.25% y trietanolamina 0.1M

1 lavado de 2 min en SSC 2x

Deshidratación de los tejidos en etanol al 75, 80, 95 y 100 % por 2 min c/u

Deslipidación en cloroformo por 5 min

1 lavado en etanol absoluto por 2 min

Hidratación en etanol al 95% por 2 min

Secado de los tejidos a temperatura ambiente.

5. 2 Hibridación *in situ* empleando el oligonucleótido de la TRH [³⁵S]

Posterior al tratamiento de fijación de los tejidos, los cortes se cubrieron con 45 µl de mezcla de hibridación que en 1 ml contuvo:

1 picomola del oligo α - dATP [^{35}S] (actividad específica $4.5 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ cpm/ μg), SSC 4x, 50% formamida, 10% dextrán sulfato, 100 mM de fosfato de sodio pH 7.4 -1% sarcosil, Denhardt's 1X (Denhardt's 100 x = 1 g de ficoll, 1 g de polivinil pirrolidona, 1 g de albúmina de bovino grado 5, H₂O para 50 ml), 250 μg de DNA de esperma de salmón (DNAss) desnaturalizado durante 15 min a 65 °C, 250 μg de tRNA de levadura, 100 mM de DTT, 250 μg de poly A y agua. Sobre la mezcla de hibridación se colocó una cubierta de Parafilm y todas las laminillas se colocaron en una cámara húmeda (con agua estéril) y se incubaron a 42 °C durante 12 hrs.

Lavados posteriores a la hibridación

Al término de la hibridación, se retiraron las cubiertas de parafilm con SSC 1X a T.A y se hicieron los siguientes lavados con agitación para retirar el oligo α - dATP [^{35}S] no hibridado:

1 lavado de 15 min en SSC 1X a T.A

2 lavados de 30 min c/u en SSC 1X, 50% formamida a 45 °C

4 lavados de 30 min c/u en SSC 0.1X, 0.02% SDS a 45 °C

Al término de los lavados, los tejidos se deshidrataron en etanoles al 75%, 80% y 95% por 2 min cada uno. Posteriormente se realizó el secado de las laminillas en forma vertical y la exposición de los tejidos a una película autoradiográfica o a una emulsión fotográfica.

5. 3 Hibridación *in situ* empleando transcritos α -UTP [^{35}S]

La mezcla de hibridación se preparó con anterioridad para cualquier ensayo de hibridación (oligos o transcritos) ya que ésta es estable a -20 °C y se puede almacenar hasta por 4 meses. Para preparar 10 ml del stock se utilizó 1 g de dextrán sulfato mezclado por inversión constante en 2.2 ml de H₂O durante 3 hrs a T.A; posteriormente se le adicionó 1 ml de SSC 20x, 100 μl de tRNA de levadura (10mg/ml), 200 μl de Denhardt's 50x y 500 μl de DNAss (10mg/ml) previamente desnaturalizado por 15 min a 65 °C. Cuando todo estuvo mezclado, se adicionó 5 ml de formamida desionizada, se mezcló y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Los ensayos de hibridación con los transcritos, se realizaron adicionando 45 μl de la mezcla de hibridación con 3×10^6 cpm del transcrito [^{35}S] por laminilla (actividad específica 1.2×10^9 cpm/ μg , previamente desnaturalizado durante 5 min a 65 °C) y 100 mM de DTT disuelto en NaOAc 0.01 M; los tejidos se cubrieron con Parafilm y la hibridación se realizó a 52 °C

durante 12 hrs en una cámara húmeda (saturada con 50% de formamida en H₂O). Posteriormente se retiraron las cubiertas de Parafilm con SSC 1X a T.A y se realizaron los siguientes lavados con agitación:

2 lavados de 15 min c/u en SSC 1X a T.A

1 lavado de 5 min en 2x SSC, 50% formamida a 52 °C

1 lavado de 20 min en 2x SSC, 50% formamida a 52 °C

2 lavados de 5 min c/u en 2x SSC a T.A

1 paso de incubación por 30 min en 2x SSC, 30 µg/ml RNAsa A, 1mM EDTA a 37 °C.

** en adelante se cambió de material para no contaminar con RNAsas el material de HIS (que también se utiliza durante la fijación del RNA a los tejidos)*

2 lavados por 3 min c/u en 2x SSC a T.A

1 lavado de 15 min en 2x SSC, 50% formamida a 52 °C

1 paso en etanol 70% por 3 min

1 paso en etanol 80% por 3 min

1 paso en etanol 95% por 3 min

3 pasos rápidos en agua

2 pasos rápidos en etanol 75%

Los tejidos se secaron en forma vertical y posteriormente se expusieron a una película fotográfica para detectar la señal a nivel macroscópico (el cRNA de *cfos* [³⁵S] se detectó en el film a los 5 días). Para detectar la señal a nivel celular, las laminillas se expusieron a una emulsión fotográfica 2.5 veces el tiempo requerido para el film. Finalmente se contratiñeron los tejidos con hematoxilina – eosina para corroborar que la señal estuviera sobre las células.

5. 4 Hibridación *in situ* empleando el cRNA de *cfos* [³⁵S] y el transcrito hidrolizado de la TRH dig

Los ensayos de doble hibridación con los transcritos, se realizaron adicionando 37.5 µl de la mezcla de hibridación para transcritos, 3x10⁶ cpm del transcrito de *cfos* [³⁵S] por laminilla (actividad específica 1.2 x10⁹ cpm/µg, previamente desnaturalizado durante 10 min a 65 °C), 100 mM de DTT disuelto en NaOAc 0.01 M y 3 µl del transcrito hidrolizado de la TRH dig previamente desnaturalizado durante 10 min a 65 °C; los tejidos se cubrieron con Parafilm y la

hibridación se realizó a 52 °C durante 12 hrs en una cámara húmeda (saturada con H₂O - 50% de formamida). Posteriormente se retiraron las cubiertas de Parafilm con SSC 1X a T.A y se realizaron los siguientes lavados con agitación:

4 lavados de 5 min c/u en 2x SSC a T.A

1 paso con RNAsa A 30 µg/ml, 2x SSC, 1 mM EDTA por 30 min a 37 °C

** en adelante se emplearon cajas previamente usadas con RNAsa*

2 lavados de 5 min c/u en 2x SSC a T.A

1 lavado de 10 min en 1X SSC a T.A

1 lavado de 10 min en 0.5x SSC a T.A

1 lavado de 5 min en 0.1X SSC a T.A

1 lavado de 30 min en 0.1X SSC a 60 °C

1 lavado de 5 min en 0.1X SSC a T.A

Enseguida se bloquearon los tejidos con 2x SSC, 0.05% tritón X-100, 2% albúmina bovina (BSA) grado RIA durante 5 hrs a T.A y agitación suave. Posteriormente se decantó la solución de bloqueo y se colocaron 45 µl del Ab dig -peroxidasa (POD) por laminilla, diluido 1:50 en buffer A [100 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM de NaCl], 0.3% tritón X-100 y 1% BSA; la mezcla se cubrió con parafilm, se colocaron las laminillas en una cámara húmeda y se incubaron a 4 °C durante 48 hrs.

5. 4.1 Revelado de las laminillas con diaminobenzidina (DAB)

Se retiró la cubierta de parafilm con buffer A y se hizo un lavado adicional en buffer A por 10 min a T.A; posteriormente se colocaron las laminillas en 0.02% DAB, 0.05% H₂O₂, 0.1 M Tris pH 7.5 en un cuarto con poca luz y se monitoreó la reacción al microscopio desde los 20 min. Para tener una buena señal de la TRH dig en el PVN de las ratas lactantes, se requirió 1 hr de incubación con el sustrato. La reacción se detuvo incubando las laminillas con 0.1M Tris HCl pH 7.5 y 0.3 M de Acetato de Amonio durante 3 min. Se dieron 2 pasos rápidos en agua, un paso en etanol 70% por 3 min y secado a T.A para exponer los tejidos a un film β max de kodak y determinar el tiempo de revelado del transcrito radiactivo en la emulsión.

6. Detección de CREBP y CREB fosforilada (CREBP-P) por inmunocitoquímica (ICC)

Se realizó la ICC de CREBP y CREBP-P en machos adultos expuestos a estrés por éter o ratas lactantes sometidas a 30 min de succión empleando un protocolo modificado previamente descrito por Kóvacs, K.J. y Sawchenko, P.E., 1996., Legradi, G. y col., 1997 (c). A diferencia de esos protocolos en los que se emplearon tejidos de animales perfundidos y procesados por flotación, se emplearon cortes de tejido congelados de 12 μ m de grosor.

Los tejidos se fijaron en paraformaldehído al 4%- PBS - vanadato de sodio 1mM - fluoruro de sodio 25mM- por 15 min. Se hicieron 2 lavados con PBS y luego se incubaron durante 15 min con H₂O₂-PBS para inactivar a las peroxididasas endógenas. Se enjuagaron en PBS por 3 min y se procedió a un paso de permeabilización con Tritón X-100 al 0.5%-PBS durante 1 hr. Posteriormente se incubaron por 90 min a T.A en suero normal de cabra al 2% previo al paso de incubación con el anticuerpo (Ab) primario correspondiente. El Ab CREBP se empleó a una dilución de 1:500 μ l en suero normal de cabra al 1%-PBS- Vanadato de sodio 1mM- fluoruro de sodio 25mM, mientras que el Ab CREBP-P (Ser133) a 1: 100 μ l (New England Biolabs # 9190). La incubación de los tejidos con los Abs se llevó a cabo en una cámara húmeda con agitación suave durante 48 hrs a 4 °C. El Ab en exceso se retiró con 2 lavados en PBS de 10 min c/u. Inmediatamente se incubaron los tejidos por 2 hrs a T.A con Ab secundario IgG cabra-anticonejo biotinilado empleando una dilución 1:200; se enjuagaron con PBS y se incubaron por 1 hr con el complejo Avidina-Biotina (Vector laboratories). Se lavaron 3 veces en PBS por 10 min c/u y se dió un paso con buffer Tris 0.05M pH 7.8 previo al revelado con DAB 0.025%- Sulfato de amonio-Niquel 0.04% y H₂O₂ al 0.0036% durante 7 min.

La reacción se detuvo con Buffer Tris 0.05M pH 7.8 y enseguida se deshidrataron los tejidos en etanol al 75%, 85%, 95% y 100% previo al paso de xilol y montaje de las laminillas con permaunt (Baxter M7630-2). Una vez secas las laminillas se analizaron por microscopia de campo claro.

7. Cuantificación de la señal del RNAm de la TRH mediante el uso de un sistema analizador de imágenes

El análisis de las imágenes se llevó a cabo empleando un software de Biocom (Histoscan, Biocom Francia). El sistema consta de un sensor de coordenadas en la platina del microscopio (marca Märzhäuser), una cámara de video COHU (#4815) montada sobre el microscopio y una pantalla de TV que permite observar la imagen ampliada de la señal. El software permitió el análisis cuantitativo de las células con señal radiactiva que se obtuvo al exponer los tejidos hibridados a la emulsión fotográfica (deposición de granos de plata sobre el tejido). En general, se cuantificó el número de células TRHérgicas en el PVN de los cortes hibridados con el oligo de la TRH [³⁵S], tanto el total (tomando como mínimo 8 granos por célula) como una subcategoría que incluyó a las células que mostraron mayor señal (arriba de 30 granos); de estos cortes se analizó también la señal para el RNAm de la TRH en toda la superficie del PVN o dividiendo la superficie del núcleo en 6 celdas que van del IIIV a la zona magnocelular. A la par se realizó la adquisición de las cartografías en las cuales queda impresa la superficie que ocupan los cúmulos de señal radiactiva sobre las células positivas al RNAm de la TRH en el corte completo.

El análisis por superficie total se realizó dividiendo al PVN en 3 bloques. El bloque anterior que incluyó a las neuronas TRHérgicas de la región parvocelular anterior, el bloque medio que incluyó la mayor parte de la región parvocelular media y el bloque posterior que incluyó la parte caudal de la zona parvocelular media (**Figura 4 A-C**).

El análisis por celdas se realizó graficando la distribución del RNAm de la TRH en el PVN a cada 3 cortes de rostral a caudal. Ambos análisis tomaron en cuenta el patrón de tinción del PVN, el patrón de distribución de la señal del RNAm de la TRH y, la proximidad de los cortes entre las distintas ratas.

En los cortes de doble hibridación se cuantificó el número total de las células TRH-dig en el PVN y de éste, las células TRH-dig que fueron positivas a *cfos*. A continuación se describe de forma detallada cada uno de los análisis realizados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

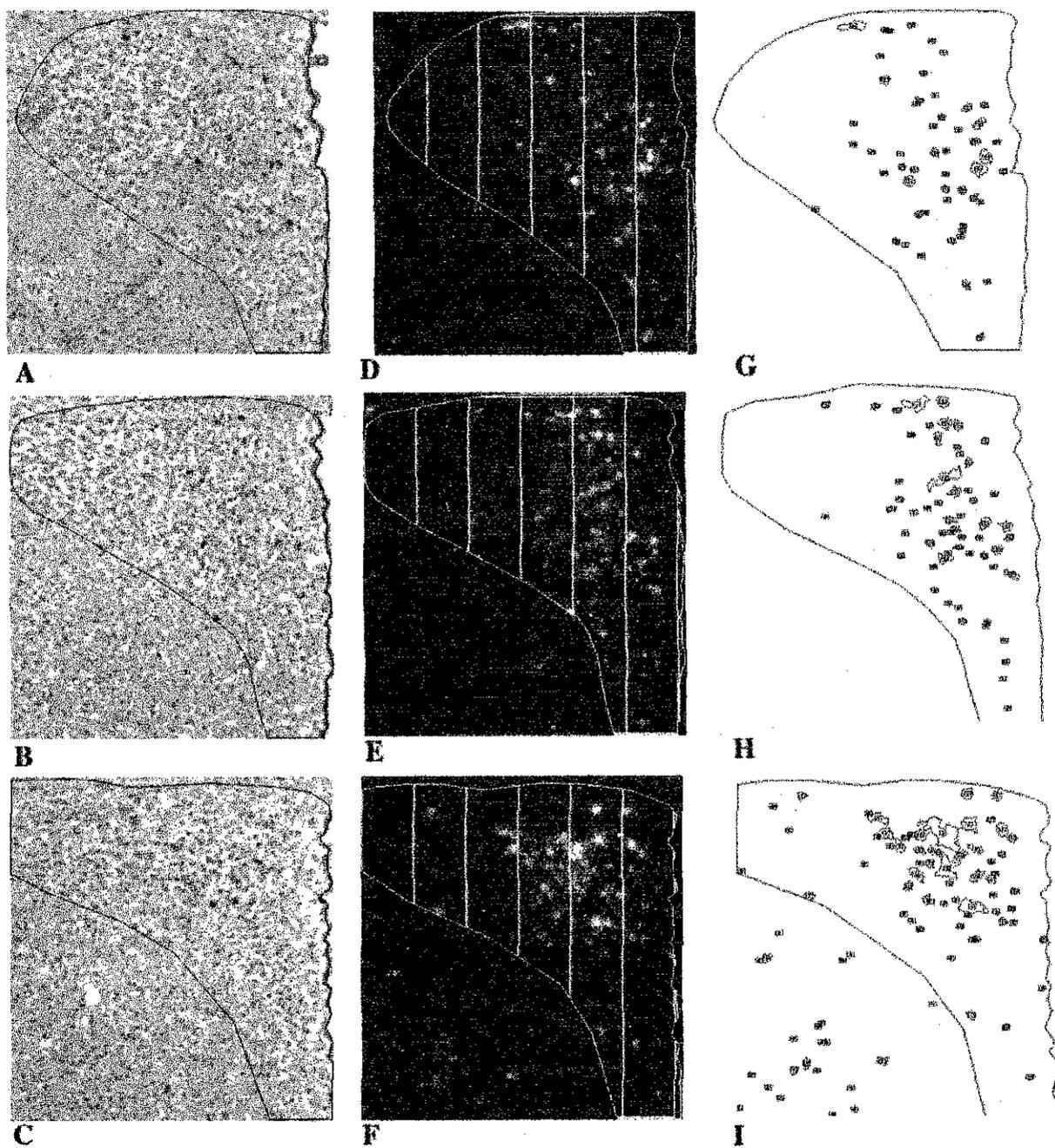


Figura 4. Imágenes representativas de la distribución de la señal para el RNAm de la TRH a través del PVN. Patrón de tinción del PVN anterior (A), medio (B) y posterior (C) de hembras lactantes analizadas por celdas (D - F). Las cartografías de G - I muestran los contornos de señal para la población celular que expresa al RNAm de la TRH en los mismos cortes. Las imágenes de A - I se capturaron directamente con el software de Biocom a una amplificación de 10X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.1 Conteo celular

Para llevar a cabo la cuantificación de las células, se utilizó un macro-comando (desarrollado por el Dr. Gabriel Corkidi) que permite contar semi-automáticamente las células positivas dentro del PVN. Inicialmente se traza el contorno del núcleo de forma manual en campo claro a un aumento de 10X. Enseguida se crea una rejilla gráfica dentro del área trazada que se ajusta de manera automática a las dimensiones del núcleo cuando se pasa al campo microscópico de 40x; el sistema de platinas motorizadas realiza el barrido automático en cada celda de la rejilla a esta última magnificación. Cada neurona es asignada a una categoría de forma manual, dependiendo del número de granos que contenga (células totales = más de 8 granos., células con mayor concentración = arriba de 30 granos); la posibilidad de contar a una misma célula 2 veces es casi nula porque: a) las células ya contadas quedan marcadas con un símbolo y b) el barrido de las celdas de la rejilla va en una sola dirección. Cada imagen analizada es procesada mediante un filtro de realce de contornos ('sharpening') para mayor nitidez de la imagen. El resultado se despliega en una tabla que contiene el número total de neuronas contadas por cada categoría, tanto en el PVN izquierdo como en el derecho.

7.2 Análisis de la señal del RNAm de la TRH por microscopía de campo oscuro

7.2.1 Análisis de la señal en el corte completo

El análisis de la señal del RNAm de la TRH se realizó en campo oscuro con el objetivo 10X. Primero se trazó el contorno del PVN en campo claro y posteriormente, en campo oscuro se midió la densidad óptica integrada de la señal (DOI) (calibrada en granos de plata), que utiliza la luz reflejada por los cúmulos de granos de plata de la emulsión fotográfica que precipitaron sobre las zonas del tejido en las que el oligo [³⁵S] hibridó con el RNAm de la TRH. La DOI cuantificada (granos totales de plata) corresponde a la cantidad de RNAm presente en las neuronas TRHérgicas del PVN. El resultado se despliega en una tabla que contiene la cantidad de granos totales por cada cúmulo dentro del PVN, así como la cantidad total de granos en toda la superficie analizada.

7.2.2 Análisis de la señal regionalizando el PVN en celdas

Con la finalidad de conocer si existía una subregionalización de la señal del RNAm de la TRH en el PVN de los animales experimentales, se realizó otro tipo de análisis densitométrico. Se dividió cada lado del PVN en 6 celdas paralelas al eje del 3er ventrículo, formando una rejilla (**figura 4 D-F**). En sentido horizontal, la rejilla cubre desde el 3er ventrículo (celda #1) hasta la zona magnocelular del núcleo (celda #6) mientras que, en el sentido vertical, las celdas están delimitadas por el propio contorno del PVN.

Para realizar las medidas densitométricas regionalizadas se utilizó un macro-comando que permite trazar el contorno del PVN de forma manual en campo claro a 10X (tomado como referencia el eje del 3er ventrículo). La rejilla se ajusta de forma automática al contorno trazado y, al cambiar al campo oscuro el sistema mide (también de forma automática), la DOI expresada como nivel de gris en cada una de las celdas. Los resultados se despliegan en una tabla y se exportan para procesar los datos en un programa gráfico como Excel.

7.2.3. Cartografía de la señal en el PVN

Después de delinear el contorno del PVN en campo claro a 10X, se ilumina el tejido en campo obscuro para adquirir dos cartografías con el sistema: la primera contendrá los contornos de todas las células positivas al RNAm de la TRH y la segunda sólo los contornos de las células con mayor concentración. Para lograr esto, se realiza primero un barrido de forma semi-automática que cubra todas las zonas brillantes dentro del campo, se establece un umbral de luz que es igual para todos los cortes y se adquieren las cartografías generadas con este nivel de luz (**figura 4 G-I**). En un segundo paso, se reajusta el umbral de luz sobre la misma imagen para mapear sólo a las células con mayor concentración de RNAm y se adquiere una nueva cartografía. Ambos mapas se imprimen para evaluar los patrones de distribución de la señal dentro del núcleo y compararlos entre animales control y experimentales.

8. Análisis estadístico

El análisis estadístico del número total de células TRHérgicas o de mayor concentración, así como de las células dobles TRH-*c-fos* se realizó tomando en cuenta el valor total en el PVN es decir, con la suma del PVN izquierdo más el derecho. Esto se hizo porque no encontramos diferencias significativas entre cada lado del PVN. Se analizaron 2 cortes por zona / animal. El número de animales por grupo experimental fue de 5 en promedio. Se realizó el análisis comparativo entre grupos por análisis de varianza (ANOVA) a una $p < 0.05$ y comparaciones múltiples con la prueba de Fisher, $p < 0.05$. La prueba de t se empleó para determinar el grado de significancia en las muestras de PRL, TSH y Corticosterona y también en los datos de conteo celular (significancia $p < 0.05$, $p < 0.01$). Los datos se expresan como el valor promedio \pm el error estándar de la media (ESM) de experimentos representativos para cada condición.

El análisis de cuantificación de la señal en celdas se realizó por ANOVA a una $p < 0.05$ comparando los valores de cada celda entre controles y tratados por grupo experimental. El grado de significancia con este método se menciona en los resultados.

RESULTADOS

PATRÓN DE DISTRIBUCIÓN DEL RNAm DE LA TRH EN EL PVN DE MACHOS Y HEMBRAS VÍRGENES

Se realizó el análisis detallado de la distribución de la señal para el RNAm de la TRH en todo el PVN de un animal macho y de una hembra virgen con el fin de determinar de forma más precisa de las fronteras entre las zonas parvocelular anterior, media y posterior del PVN. Para ello, nos apoyamos en el patrón de tinción del núcleo así como en referencias anatómicas cercanas que nos permitieran "uniformar en lo posible" laminillas de distintos animales de un mismo grupo experimental. En la **figura 5** se muestran cortes representativos del PVN de cada una de las zonas, contrateñidos con hematoxilina-eosina o hibridados con el oligo de la TRH [³⁵S] en cortes de tejido de machos y hembras.

El PVN se dividió tomando siempre como referencia el inicio del núcleo (laminilla contrateñida no hibridada) en donde se observa la salida del PVN a ambos lados del tercer ventrículo (IIIIV), a los fórnix (ligeramente por encima del PVN) alineados con la base del IIIIV y, al quiasma óptico semiabierto. A partir de este corte se consideró como zona parvocelular anterior (figura 5A) que abarca aproximadamente 1600-1800 μ m del núcleo [Atlas de Palkovits, M. y Brownstein, M.J., 1988]. La aparición de la zona magnocelular posterior en la parte lateral- superior del núcleo (figura 5B), marca el fin de la zona anterior y el inicio de la zona media. Esta región es un poco más extensa que la zona anterior (1800-2100 μ m) y por tinción el PVN se observa en forma de una "mariposa extendida". El inicio de la zona posterior está marcado por la migración de las células TRHérgicas hacia la parte dorsal del núcleo; en esta zona las células se agrupan en forma de cúmulos y se separan del IIIIV (2100-2300 μ m). El PVN contrateñido se ve alargado hacia la zona lateral y más angosto respecto al IIIIV (fig 5C), mientras que los fórnix han migrado hacia la parte inferior de los costados del núcleo y el quiasma óptico se ve abierto. Es importante recordar que en la literatura, la región parvocelular del PVN se subdivide en anterior, media, periventricular, dorsal y lateral [Swanson, L.W. y Kuypers, H.G., 1980] y que en nuestros análisis, utilizamos el término posterior para identificar a los cortes de la zona parvocelular media que se encuentran en la parte caudal de núcleo. Los puntos de referencia al atlas de Palkovits están descritos para el

PVN del macho sin embargo, podemos apreciar patrones de tinción comunes entre ambos géneros.

El patrón de distribución del RNAm de la TRH del macho en nuestros cortes, fue igual al previamente reportado [Segerson, T.P. y col., 1987], la señal se encuentra distribuída de forma homogénea en toda la región parvocelular anterior (figura 5D). A nivel de la zona media se observa un alineamiento de la señal paralela al IIIV que se mantiene en pocos cortes (figura 5E) y después se observa de nuevo una distribución más homogénea en las zonas parvo, que tiende a migrar hacia la parte dorsal del PVN cuando los cortes avanzan hacia la zona caudal. La región posterior se distingue porque las células forman cúmulos que se separan discretamente del IIIV (figura 5F). A este nivel, la mayoría de las células se encuentra en la parte superior del núcleo y ya no se observan células a lo largo del IIIV.

El panel derecho de la figura 5 (G-I) muestra cortes representativos de la señal del RNAm de la TRH por HIS de una hembra en diestro; aunque el patrón de distribución no es idéntico en todas las etapas del ciclo estral o durante la lactancia, se pueden apreciar patrones comunes. Por ejemplo, al igual que en los machos, la señal para el RNAm de la TRH es homogénea en la zona anterior mientras que en la zona media se pueden observar ligeras variaciones, ya sea que se observen pequeños cúmulos de células en uno u ambos lóbulos del núcleo (similares a los que se observan en la zona caudal del PVN del macho, no señalado en los esquemas) o alineamientos a lo largo del IIIV (figura 5H). La zona posterior también se caracteriza por presentar a las células con RNAm de la TRH en forma de cúmulos.

Con base a estas observaciones, monitoreamos la respuesta al estímulo del frío por hibridación *in situ* tanto de hembras como de machos en el corte completo por bloques anterior, medio y posterior. Si bien encontramos cambios significativos al cuantificar la señal del RNAm de la TRH en el corte completo de los machos expuestos al frío tanto en los bloques del PVN como en el número de células que contuvo mayor concentración de RNAm de la TRH, esta estrategia no nos permitió determinar si las células que respondieron al estímulo se segregaban en zonas específicas del PVN o no. Por tanto, se desarrolló un sistema de análisis en el cual la señal del PVN se subdividió en celdas y se analizó la distribución de la señal en laminillas alternas -cada 3 laminillas- de la zona rostral a la caudal del PVN (ver métodos).

P V N

H I S

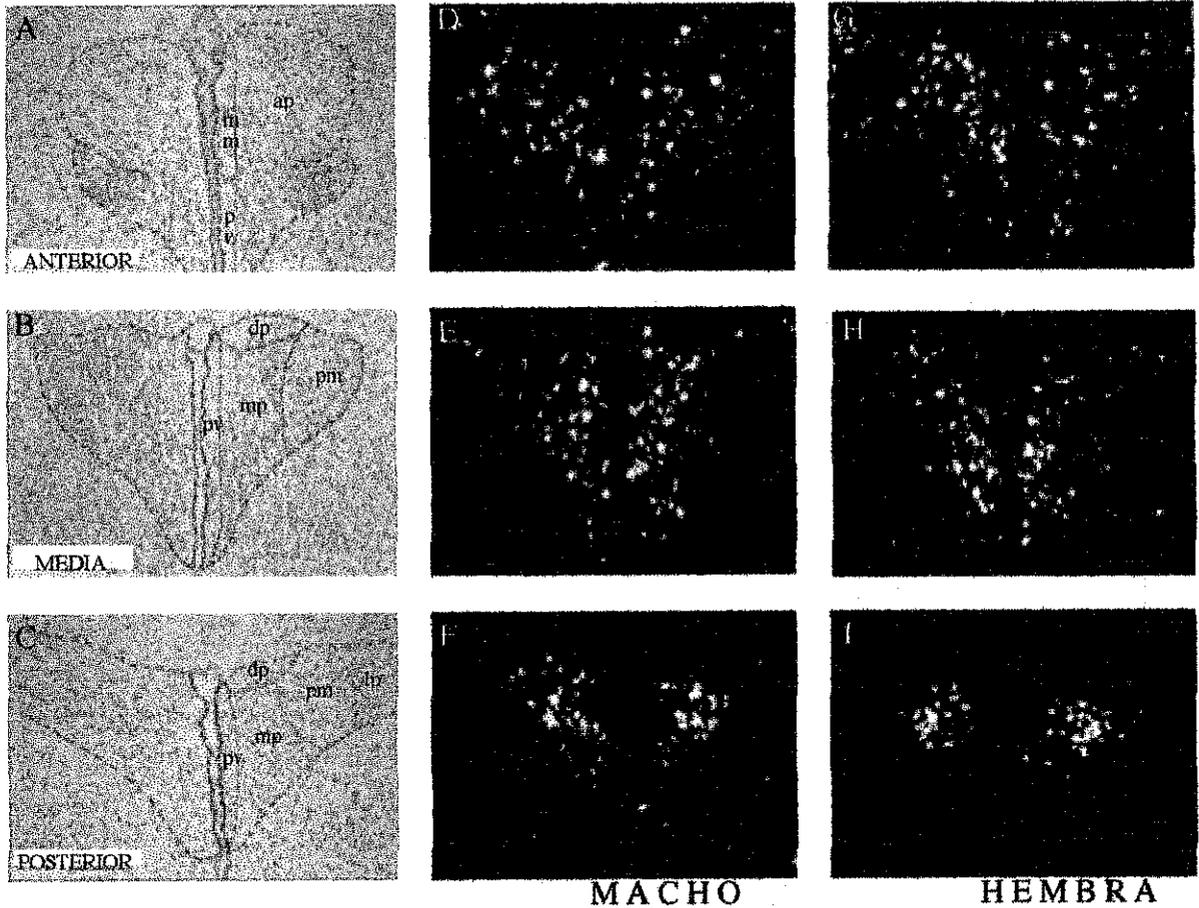


Figura 5. Distribución del RNAm de la TRH en el NPV de machos y hembras adultos. Cortes coronales de 12 μ m de grosor hibridados con un oligonucleótido 35 S y expuestos a una emulsión fotográfica durante 10 días. A-C: patrón de tinción (hematoxilina- eosina) de cortes representativos en el PVN de rostral a caudal así como las subdivisiones parvo y magnocelulares descritas por Swanson y Kuypers, 1980. [mm: media magno, pv: periventricular, ap: parvo anterior, dp: parvo dorsal, mp: parvo medio, pm: magno posterior, lp: parvo lateral]. D-I: microradiografías representativas de la distribución de la señal del RNAm de la TRH por ISH en la región anterior, media y posterior del NPV. Amplificación :10 X.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESPUESTA DE MACHOS Y HEMBRAS VÍRGENES A 1 HR DE ESTIMULACIÓN POR FRÍO

Respuesta hormonal

Los animales experimentales se aclimataron durante 5 días a 30 °C. Los controles se sacrificaron en el bioterio alrededor de las 9 am, inmediatamente después de haber sacrificado a los animales del cuarto frío (4 C). La respuesta de los ejes tiroideo y adrenal al estímulo de frío se determinó mediante la cuantificación de las hormonas séricas TSH y corticosterona del suero; como se puede observar en la tabla III, los animales incrementaron de forma significativa el nivel basal de ambas hormonas en respuesta a 1 hr de exposición a frío ($p < 0.05$).

Tabla III. Niveles séricos de TSH y corticosterona en machos y hembras vírgenes aclimatados, sometidas a estimulación por frío

		TSH (ng/ml)	CORTICOSTERONA (ng/ml)
MACHOS	TEMP. AMBIENTE	3 ± 1	589 ± 66
	1 HR A 4 °C	7 ± 1 *	1444 ± 215 *
HEMBRAS	TEMP. AMBIENTE	2 ± 1	416 ± 72
	1 HR A 4 °C	5 ± 1	1146 ± 279 *

(n = 5 ratas por grupo)

Análisis de la señal del RNAm de la TRH en el corte completo dividiendo al PVN en anterior, medio y posterior o en celdas

Se realizó la HIS de cortes representativos para cada una de las zonas del PVN (2 cortes/zona = 6 por animal) y posteriormente se cuantificó la señal del RNAm de la TRH directamente sobre las laminillas emulsionadas (microscopía de campo oscuro), tomando como referencia la cantidad de luz (densidad óptica integrada) que emiten los granos de plata de la película fotográfica que se depositan sobre el tejido que expresa al RNAm. El análisis por zonas, mostró incrementos significativos en la expresión del RNAm de la TRH de todas las zonas del PVN. La respuesta en la zona anterior fue de * 272 ± 44 %, en la media de * 234 ± 36 % y en

la posterior de $* 255 \pm 52 \%$ [Controles = $100 \% \pm$ esm: anterior = $7,037 \pm 771$ nCi / mg. tej. equiv., media = $6,824 \pm 477$ nCi / mg. tej. equiv., posterior = $2,472 \pm 664$ nCi / mg. tej. equiv.] (figura 6 A).

La figura 6 (B-C) muestra una vista panorámica de la señal del RNAm de la TRH de los machos control y los estimulados por frío, analizados por celdas. Las líneas verticales señalan las divisiones entre las distintas celdas de 6i a 6d mientras que las horizontales muestran el nivel del PVN al cual se tomaron los cortes muestreados (de rostral a caudal). Dado que la zona media contiene más cortes que la anterior y posterior, analizamos un número mayor de laminillas en un segundo ensayo con el fin de tener un mapa más completo de la señal en la dirección rostro caudal (5 cortes /rata para la zona media, 2 cortes/rata para las zonas anterior y posterior). Como se puede observar, en las ratas control, la intensidad mayor de la señal para el RNAm de la TRH se distribuye en la parte central del núcleo, a los lados del HIV (celdas 2 y 3); es muy posible que esta area incluya a la zona periventricular del PVN. Los últimos cortes de la zona media y los primeros de la zona posterior, presentan la señal en forma de cúmulos (celdas 2 a 4), similar a lo que se observa en la micrografía de la figura 5F. Comparando controles contra estimulados observamos que, en general, la señal se intensificó de rostral a caudal (el color naranja sustituyó al rojo en el fondo de la gráfica), pero la respuesta fue más evidente en las zonas anterior y media (celdas 1 a 5 con mayor señal).

Al analizar el número total de células que expresa al RNAm de la TRH en el PVN y el número de células TRHérgicas con mayor concentración de RNAm, encontramos que, mientras que el total se mantiene similar entre controles y experimentales (89 ± 9 vs 87 ± 3), la proporción de células con mayor concentración aumenta de forma significativa a lo largo del PVN (de 11 ± 1 a $* 34 \pm 2$, $p < 0.05$).

A la par se realizaron los mismos análisis en cortes provenientes de hembras vírgenes control y estimuladas por frío. Las ratas respondieron al estímulo aumentando la corticosterona del plasma de forma significativa (tabla III). Si bien el nivel de TSH de las ratas sometidas al frío aumentó respecto a los controles, la variabilidad de la respuesta fue alta y el resultado no fue estadísticamente significativo. Tampoco se observaron cambios significativos entre los niveles de expresión del RNAm de la TRH de las ratas sometidas al frío y los animales control ni en el corte completo (figura 7) ni en el análisis por celdas. Se detectaron más variaciones en la zona

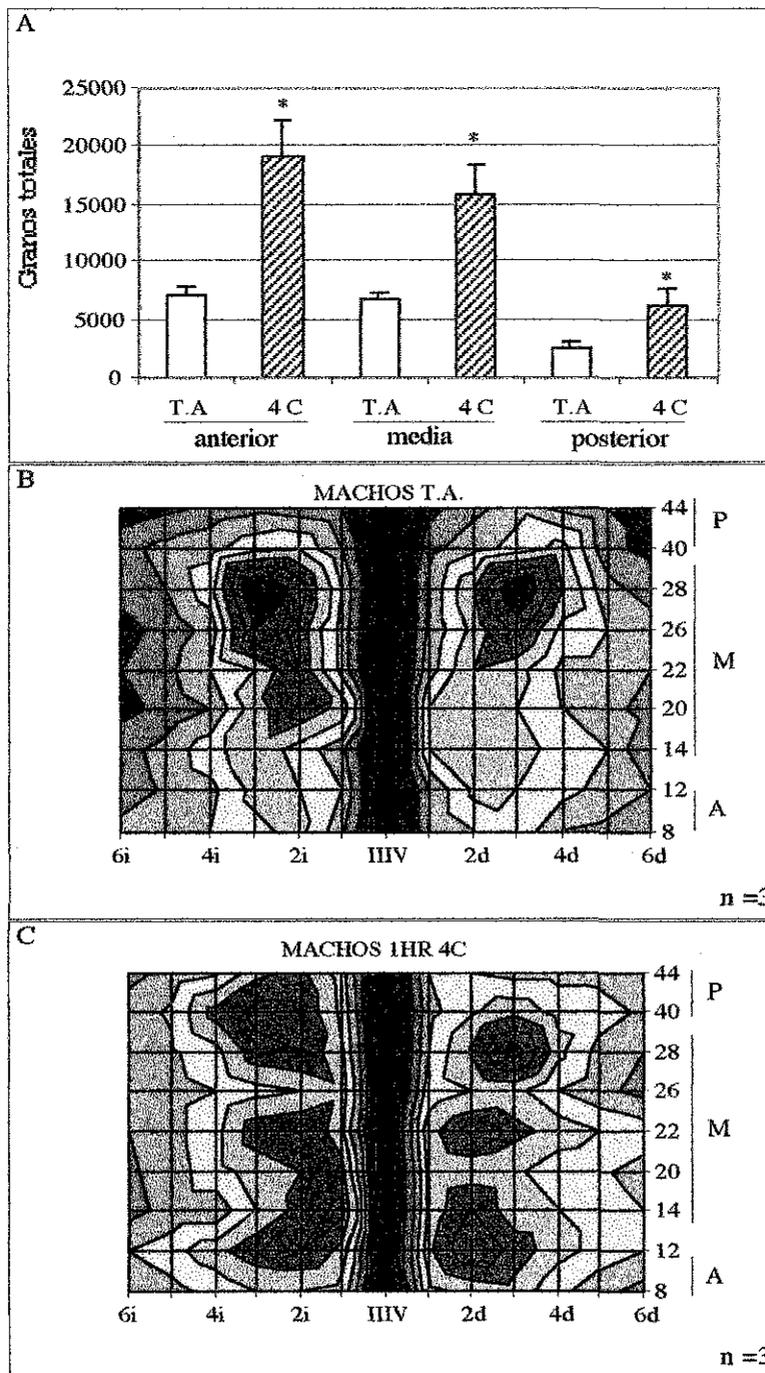


Figura 6. Análisis de la expresión del RNAm de la TRH en el PVN de machos expuestos a 1 hr de estrés por frío. La gráfica en A, representa el valor promedio \pm e.s.m. de la señal total en el PVN anterior, medio y posterior de ratas expuestas a 1 hr de frío (4C) o mantenidas a temperatura ambiente (T.A.). Las gráficas en B y C muestran una vista panorámica de la señal del RNAm de la TRH en el PVN analizado por celdas. Eje X (6i - 6d): número de celdas en las que se dividió al PVN (i = PVN izquierdo, d = PVN derecho), Eje Y: cortes analizados de rostral a caudal señalando la ubicación anterior (A), media (M) y posterior (P). Los colores indican la señal del RNAm expresada en densidad óptica (Unidades arbitrarias $\times 10^4$). IIIV = tercer ventrículo.



15 JUN
 FALLA DE ORIGEN

anterior respecto a la media y posterior pero la dispersión fue alta y no hubo diferencias entre las ratas control y las sometidas al frío. Es posible que la variabilidad en la respuesta se haya debido en parte a la influencia que el ciclo estral tiene sobre la expresión basal del RNAm de la TRH [Uribe, R.M. y col., 1991] sin embargo, ésta no fue evaluada en este estudio.

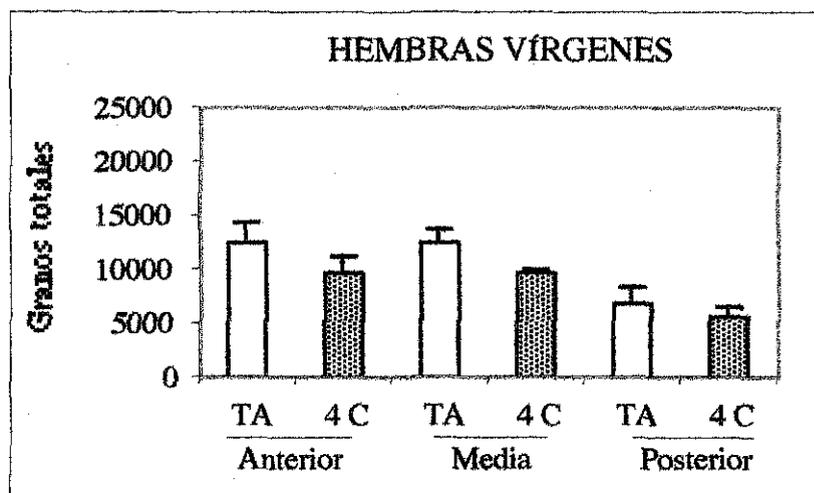


Figura 7. Expresión del RNAm de la TRH en el PVN de hembras vírgenes estimuladas por frío. Las barras señalan la cantidad de RNAm promedio \pm esm, presente en el PVN de ratas control (TA) y experimentales (4C) en los bloques anterior, medio y posterior. ($n=5$ ratas)

Expresión de c-fos en el PVN de machos y hembras sometidos a 1 hr de estrés por frío.

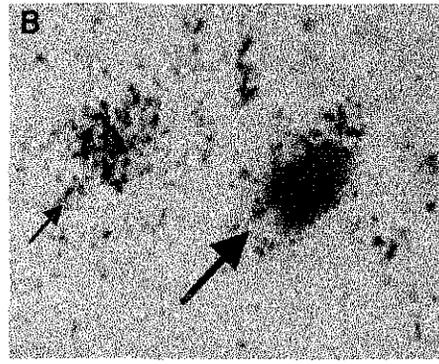
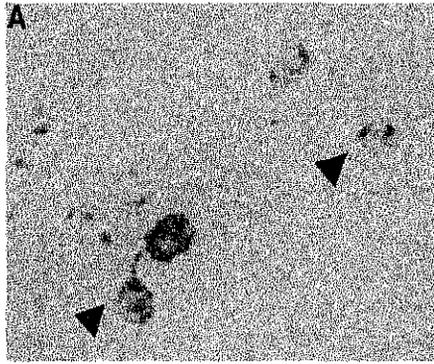
Se hicieron ensayos de doble hibridación (DHIS) con el fin de saber si en respuesta a estimulación por frío, se activaba la expresión del gen *c-fos* en la población TRHérgica tanto de machos como de hembras. Al igual que lo previamente reportado para los machos [Zoeller, R.T. y col., 1995], encontramos que, solamente parte de la población induce la expresión de *c-fos*. Mientras que en los machos control hubo un porcentaje de colocación del RNAm de la TRH y de *c-fos* del $7 \pm 3\%$ en todo el PVN, en las ratas expuestas al frío el porcentaje se incrementó a $* 21 \pm 3\%$ ($p < 0.05$). Por primera vez se mapeó la respuesta de *c-fos* en hembras vírgenes sometidas a frío y se encontró que *c-fos* se activa en las células TRHérgicas del PVN. En las ratas control el porcentaje de colocación del RNAm de la TRH y de *c-fos* fue de $11 \pm 2\%$ mientras que en las estimuladas por frío el porcentaje de colocación aumentó a $* 28$

$\pm 1 \%$ ($p < 0.05$) a lo largo del PVN. Al analizar el número de células dobles por bloques, encontramos que el incremento se dió en las 3 zonas del PVN de los machos mientras que, en las hembras, éste fue mayor en las zonas media y posterior del núcleo (**tabla IV**). La expresión total de *c-fos* en el PVN (cuantificación de la señal en el film, **tabla IV**) aumentó de forma significativa en los machos pero no en las hembras. Se observó activación de la expresión de *c-fos* en la corteza cerebral y parte del tálamo tanto de hembras como de machos expuestos a frío (no señalado).

LACTANTES SOMETIDAS A ESTIMULACIÓN POR FRÍO

Respuesta hormonal

Se analizaron los niveles de TSH, Corticosterona y PRL en sangre de hembras a mitad de la lactancia (día 12-14) sometidas a estimulación por frío. La respuesta hormonal al estímulo puede variar si las madres se separan o no de sus crías por lo que analizamos dos grupos de ratas en el mismo lote con el fin de comparar el nivel de activación tanto del eje adrenal como del tiroideo. En uno de los grupos, las madres se movilizaron del bioterio sin sus crías (SC) a un cuarto a T.A -adjunto al cuarto frío- 8 hrs antes del experimento; en el otro grupo las madres y sus crías (CC) se movilizaron al cuarto a T.A 8 hrs antes del experimento. Si bien observamos respuestas en las hembras vírgenes y los machos estimulados con 1 hr de frío, no existen antecedentes en la literatura de exposición de hembras lactantes al estímulo del frío. Por lo tanto, una parte del grupo SC recibió el estímulo de frío por 30 min y la otra parte por 1 hr. La respuesta de TSH en la sangre fue mayor en el grupo estimulado por frío durante 30 min vs el grupo estimulado por 1hr; no se detectaron cambios en los niveles de TSH en el plasma de las ratas que permanecieron todo el tiempo con sus crías y que se sometieron a 1hr de frío (**tabla V**). Los niveles de corticosterona del plasma aumentaron 7 veces en los grupos SC vs 2 veces en el grupo CC. Es importante mencionar que en el grupo CC, la mayoría de las madres permaneció cerca de sus crías en señal de alerta durante la exposición al frío. Estas ratas no mostraron cambios significativos en los niveles circulantes de PRL y el nivel de la hormona fue alto en las ratas control. La variabilidad en los niveles de PRL en las madres expuestas al frío CC, pudiera deberse a que durante la estimulación algunas crías succionaron



	Porcentaje de expresión de <i>c-fos</i> en el NPV (autoradiografía)			Porcentaje de células TRHérgicas en el NPV que coexpresan al RNAm de <i>c-fos</i>		
	A	M	P	A	M	P
Machos:						
T.A.	100 ± 2	100 ± 2	100 ± 3	1 ± 0.1	7 ± 3	9 ± 3
1 hr a 4 °C	*163 ± 5	*154 ± 6	*132 ± 7	*19 ± 3	18 ± 3	*29 ± 3
Hembras vírgenes:						
T.A.	100 ± 8	100 ± 3	100 ± 8	21 ± 5	10 ± 2	8 ± 3
1 hr a 4 °C	128 ± 10	138 ± 28	110 ± 7	31 ± 3	*25 ± 2	*42 ± 7

Tabla IV. Expresión del RNAm de *c-fos* en el NPV de machos y hembras expuestos a 1hr de estrés por frío. Los tejidos se hibridaron con sondas de cRNA marcadas con dig - UTP (precipitado café) ó [³⁵S] α-UTP (cúmulos de granos). A: células positivas al RNAm de TRH (triángulos) (amplificación 10X), B: células positivas al RNAm de *c-fos* (flecha angosta) y células dobles RNAm de *c-fos* - RNAm de TRH (flecha ancha) (amplificación 40X). La tabla muestra el nivel de expresión de *c-fos* en el NPV (analizado por film, controles = 100 % ± esm) por bloques anterior (A), medio (M) y posterior (P) y células TRHérgicas del NPV (analizado por microscopía de campo claro) en las mismas zonas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a sus madres por períodos variables de tiempo mientras que otras crías no succionaron. En el grupo SC el nivel de PRL en sangre fue bajo y no cambió en respuesta al estímulo (tabla V).

Tabla V. Niveles séricos de TSH, Corticosterona y PRL en hembras lactantes estimuladas por frío y/o succión.

		TSH (ng/ml)	Corticosterona (ng/ml)	Prolactina (ng/ml)
Lactantes SC	T.A	4 ± 1	50 ± 6	25 ± 5
	30 min 4°C	9 ± 1*	384 ± 114 *	--
	60 min 4°C	6 ± 1	350 ± 20 *	27 ± 4
	30 min succión	5 ± 0.2	314 ± 33 *	110 ± 40 *
Lactantes CC	T.A	4 ± 1	195 ± 57	> 100
	60 min 4°C	5 ± 1	422 ± 17 *	120 ± 43
Lactantes SC	T.A	4 ± 0.1	572 ± 93	95 ± 12
	30/30 succ / 4°C	9 ± 1*	1174 ± 271	522 ± 158 *
	10/60 succ / 4°C	11 ± 1*	846 ± 261	708 ± 168 *

Ratas a mitad de la lactancia (día 12-14) se separaron de sus crías por 8 hrs (SC) o bien se mantuvieron con ellas a lo largo del experimento (CC). Posteriormente recibieron un estímulo de frío o de succión y se sacrificaron inmediatamente después del estímulo. En los grupos combinados se regresaron a las crías para que succionaran por 30 o 10 min y luego se colocaron al frío por 30 o 60 min respectivamente. * $p < 0.05$ (t de student vs controles; $n = 5$ ratas por grupo experimental). Los niveles de PRL > 100 se encuentran por encima del límite de saturación para el RIA (1000 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$), -- no se determinó.

Expresión del RNAm de la TRH en el PVN

El análisis de la señal para el RNAm de la TRH en el PVN mostró, que en las hembras lactantes sometidas a frío, la expresión del RNAm aumenta de forma significativa a 1 hr de estimulación (**figura 8**). El análisis por zonas en el corte completo muestra que el incremento se dá a lo largo del PVN, de rostral a caudal y que la respuesta es mayor cuando las hembras se separan de sus crías previo a la estimulación (**figura 8 A vs D**). Si bien las ratas sometidas a 30 min de frío mostraron cambios significativos en TSH y corticosterona, el nivel de expresión del RNAm de la TRH se mantuvo similar al de las ratas control a lo largo del PVN (**figura 8D**). El número total de células TRHérgicas en el PVN fue similar entre controles y

experimentales a 1 hr de estimulación por frío sin embargo, la población TRHérgica con mayor concentración de RNAm aumentó del 20-75% en ambos grupos [(CC: 173% ± 52 en anterior, 156% ± 57 en media, 150% ± 48 en posterior; controles = 100% ± 25), (SC: 170% ± 15* en anterior, 141% ± 13 en media, 120% ± 8 en posterior; controles = 100% ± 23)].

El análisis densitométrico del RNAm de la TRH en el PVN por celdas, mostró que en las lactantes SC expuestas a 1hr de frío el incremento fue más evidente entre las celdas 1-3 (zona periventricular de PVN) de las regiones anterior y media del núcleo (figura 8F).

El nivel basal de RNAm de la TRH fue mayor en las ratas CC (fig 8B vs E) y la respuesta al frío fue más evidente hacia las zonas media y posterior del núcleo; en estas ratas la señal se difundió desde la celda 1 hasta la 4 (fig 8C).

Expresión de c-fos en el PVN

Se analizó la expresión de *c-fos* con el fin de saber si en respuesta al frío, se activaba el gen de *c-fos* en las ratas lactantes. En condiciones basales no se detectó al RNAm de *c-fos* en el PVN (tabla VI). Se detectó activación de *c-fos* desde los 30 min de estimulación por frío pero su nivel de expresión no aumentó más con 1 hora de estimulación. El análisis por densitometría de los cortes expuestos al film mostró incrementos significativos en todas las regiones del PVN tanto a los 30 min como a la hora de frío (ANOVA, LPS fisher $p < 0.01$). El análisis de la señal por microscopía de campo claro mostró que el porcentaje de colocalización TRH-*c-fos* fue de 25-30% promedio a lo largo del núcleo. Las neuronas TRHérgicas adyacentes al PVN (células perifornicales) no colocalizaron con *c-fos* ni en la condición basal ni en los grupos expuestos a frío (no señalado). No se encontró correlación entre las células TRHérgicas que expresaron mayor concentración de RNAm de la TRH y colocalización con *c-fos*; algunas de las células dobles mostraron una señal abundante para el RNAm de la TRH y otras una señal débil. En general las células dobles presentaron cantidades moderadas a bajas para el RNAm de *c-fos* si se compara la señal con otras células dentro del PVN que fueron positivas a *c-fos* pero negativas a la TRH.

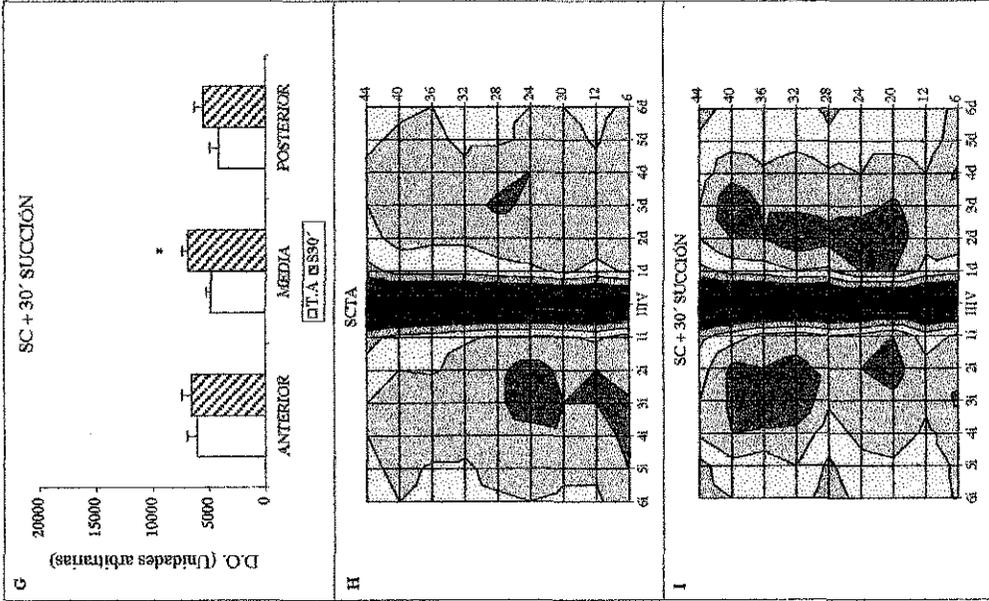
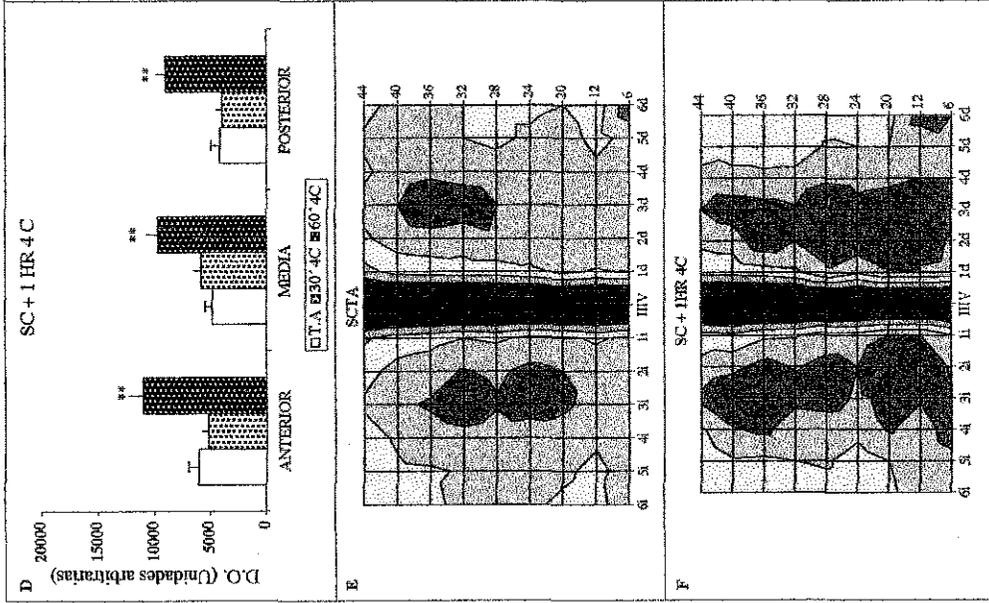
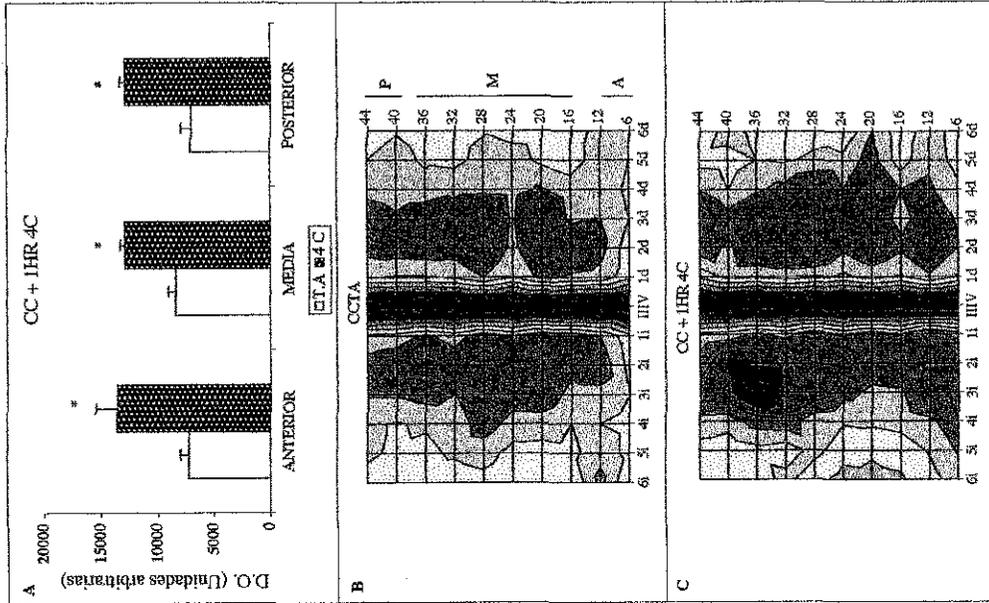


Figura 8. Expresión del RNAm de la TRH en el PVN de ratas lactantes expuestas a frío o succión. Las gráficas en A, D y G representan el valor promedio \pm esm de la señal total en el PVN analizado por zonas en los grupos con crías (CC) + 1hr de frío (4C), sin crías por 8 hrs (SC) + 30 min o 1 hr de frío (4C) y, sin crías por 8 hrs (SC) + 30 min de succión. $n=4$; $*p<0.05$. Las gráficas en B, C, E, F, H, I muestran una vista panorámica de la señal del RNAm de la TRH en el PVN de los grupos señalados aplicando el análisis por celdas descrito en la figura 6. Los colores indican la señal del RNAm expresada en densidad óptica (Unidades arbitrarias $\times 10^4$). $n = 5$ ratas por grupo experimental. ■ 0-3 ■ 3-6 ■ 6-9 ■ 9-12 ■ 12-15 ■ 15-18 ■ 18-21 ■ 21-24 ■ 24-27 ■ 27-30 ■ 30-33 ■ 33-36

TEJIS CON
FALSA DE ORIGEN

Tabla VI. Expresión del RNAm de *c-fos* en el PVN de hembras lactantes expuestas a 1hr de estrés por frío.

	<i>Nivel de c-fos en el PVN expresado en porcentaje</i>			<i>Porcentaje de células TRHérgicas en el PVN que coexpresan al RNAm de c-fos</i>		
	A	M	P	A	M	P
T.A	100 ± 2	100 ± 3	100 ± 1	0	0	0
30 min 4 °C	*125 ± 2	*132 ± 4	*123 ± 8	*28 ± 12	*39 ± 1	*22 ± 5
60 min 4 °C	*124 ± 6	*124 ± 3	*125 ± 5	*25 ± 1	*27 ± 2	*23 ± 1

Ratas a mitad de la lactancia (día 12-14) separadas de sus crías por 8 hrs y posteriormente sometidas a un estímulo de frío por 30 o 60 min. El nivel de expresión de *c-fos* se analizó por autoradiografía de la señal del PVN [controles = 297 ± 5 nCi/ mg tej. equiv. expresado en porcentaje (%) ± esm] o directamente sobre las células TRHérgicas del PVN [total = 90 ± 5 células /corte] utilizando microscopía de campo claro. Zonas anterior (A), media (M) y posterior (P) del PVN. *p<0.01 (ANOVA, LPS fisher vs controles; n=5 ratas / grupo experimental).

LACTANTES SOMETIDAS A ESTIMULACIÓN POR SUCCIÓN

Respuesta hormonal

La respuesta al estímulo de succión se midió en hembras lactantes previamente separadas de sus crías por 8hrs en el mismo lote de ratas descrito para los experimentos de frío. Las ratas succionadas por 30 min incrementaron 4 veces su nivel de PRL en sangre y, el nivel basal de corticosterona en sangre aumentó 6 veces, similar a lo observado para el grupo de frío SC; TSH no cambió en respuesta a la succión (tabla V).

Análisis de la expresión del RNAm de la TRH

El análisis de la señal en el corte completo mostró un aumento significativo en el nivel de expresión del RNAm de la TRH preferencialmente en la zona media del núcleo (figura 8G) sin embargo, en otros lotes de ratas observamos que la tendencia a la respuesta también se encuentra en la zona posterior del núcleo (no señalado), similar a lo observado cuando analizamos el número de células con mayor concentración de RNAm en este lote.

Encontramos que, al igual que en los grupos expuestos a frío, el número total de células TRHérgicas en el PVN no cambia después del estímulo pero el número de células con mayor concentración de RNAm de la TRH aumenta de forma significativa en las zonas media y posterior de las ratas sometidas a 30 min de succión (anterior: $150\% \pm 52$, media: $*176\% \pm 22$, posterior: $**192\% \pm 11$; controles = $100\% \pm 25$). El análisis de la señal por celdas mostró que el incremento en la expresión del RNAm de la TRH se localiza principalmente en el área periventricular del núcleo (celdas 1 a 3, figura 8I) a nivel del PVN medio y posterior. A diferencia de las ratas estimuladas por frío, no encontramos cambios en la expresión del RNAm de la TRH en la zona anterior de las ratas succionadas.

A la par analizamos cortes a lo largo del PVN hibridados con el cRNA de *c-fos*^{35S} y con el cRNA -dig de la TRH (por doble hibridación) en rebanadas contiguas a las empleadas para la HIS. No encontramos inducción del gen *c-fos* en ninguna de las ratas succionadas y al igual que en los controles, la señal para *c-fos* en el PVN fue nula. En un intento por encontrar otro IEG que respondiera al estímulo de succión, medimos el patrón de la proteína CREBP fosforilada (CREBP-P) en esta condición. Realizamos inmunocitoquímicas para CREBP y CREBP-P en cortes contiguos a los empleados para HIS y, mientras que el hipocampo y la corteza cerebral presentaron señal para CREBP-P, el PVN no mostró señal. Previamente medimos la inmunocitoquímica para ambas proteínas en ratas macho expuestas a estrés por éter. Al igual que lo reportado por Legradi, G. y col., en 1997, CREBP se localiza en todo el PVN en machos control mientras que CREBP-P sólo en la zona magnocelular del PVN; en respuesta al estrés por éter, los machos expresan al CREBP-P tanto en la zona magnocelular como en la parvocelular del PVN (figura 9).

LACTANTES SOMETIDAS A ESTIMULACIÓN POR SUCCION Y FRIO

Con el objeto de determinar si las mismas células responden al frío y a la succión, medimos la expresión del RNAm de la TRH en un lote de ratas lactantes sometidas a ambos estímulos. Las lactantes sin crías de este lote, se dividieron en 2 grupos. En el primero se permitió que las crías succionaran por 30 min y enseguida se colocaron tanto madres como crías en el cuarto frío por 30 min (30/30). En el segundo, se dejó que las crías succionaran por 10 min y

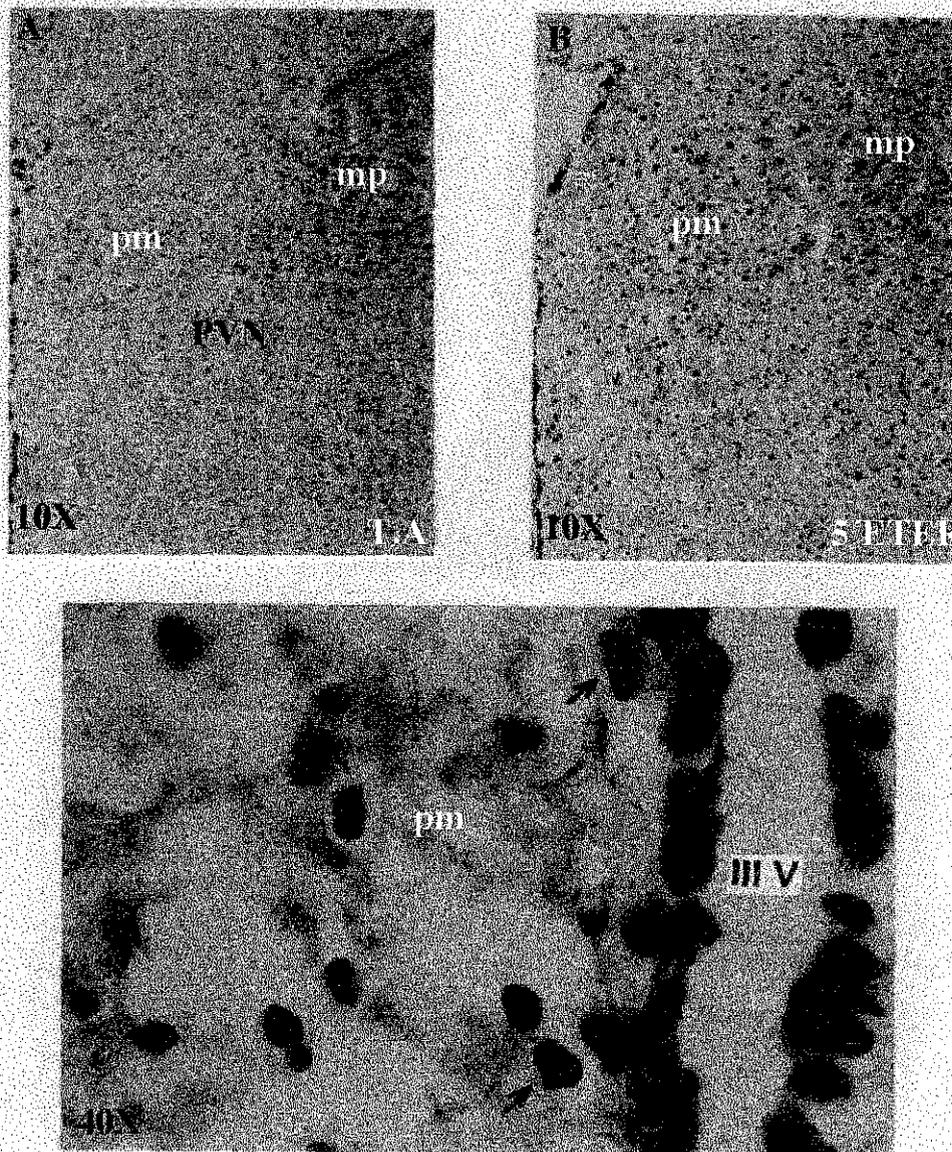


Figura 9. Inducción de CREB fosforilado (CREBP-P) en neuronas del PVN de machos adultos sometidos a estrés agudo por éter. A: en condiciones basales no hay señal para CREBP-P en la región parvocelular media (pm); solamente en la zona magnocelular posterior (mp). B: 5 min de exposición a éter aumentan de forma significativa la inmunoreactividad para CREBP-P en el NPV parvocelular. C: Amplificación de la señal a 40X, IIIV: tercer ventrículo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

enseguida se colocaron madres y crías en el cuarto frío durante 1 hr (10/60). La respuesta a TSH y PRL fue evidente en ambos grupos: el incremento en TSH fue de 2 y 3 veces respectivamente mientras que en PRL de 5 y 7 veces respectivamente (tabla V). El nivel de corticosterona en sangre también aumentó pero no fue significativo debido a que los controles presentaron valores altos (tabla V).

Análisis de la expresión del RNAm de la TRH

El análisis de la señal en el corte completo, mostró incrementos en la expresión del RNAm de la TRH a lo largo del núcleo en los dos grupos combinados pero la respuesta fue mayor en el grupo 10/60 (**figura 10 A**). A diferencia de los grupos que recibieron los estímulos de frío o de succión por separado, estas ratas presentaron cambios importantes en la población de células con mayor concentración de RNAm de la TRH en el PVN (30/30 anterior: *238% ± 71, media: **295% ± 26, posterior: *200 ± 1; 10/60 anterior: **288% ± 53, media: **300% ± 30, posterior: **250% ± 74; controles= 100% ± 22, *p< 0.05, **p<0.01).

En el análisis de la señal por celdas encontramos que, al igual que lo observado con el conteo celular, la respuesta a los estímulos combinados activa neuronas TRHérgicas en todo el PVN, desde la zona rostral hasta la caudal (**figura 10 C y D**). En general se observa que las células TRHérgicas con mayor concentración de RNAm se distribuyen en las zonas vecinas al 3er ventrículo aunque, en estos grupos, la respuesta se extiende hacia las otras zonas parvocelulares del PVN (celdas 1 a 4 en el grupo 30/30, todas las celdas en el grupo 10/60). El análisis de la señal en la dirección rostro caudal, muestra una respuesta mayor en el grupo 10/60.

Distribución de células con mayor concentración de RNAm de la TRH en el PVN de ratas lactantes estimuladas por frío y/o succión

Con el fin de identificar de manera precisa los sitios dentro del PVN en los que se localizan las células con mayor concentración de RNAm de la TRH en todos nuestros grupos experimentales, imprimimos los contornos de las células que expresaron arriba de 30 granos sobre su superficie (ver métodos) y comparamos el patrón de distribución de las células TRHérgicas con los mapas reportados por Swanson, L.W. y Kuypers, H.G. en 1980, en donde

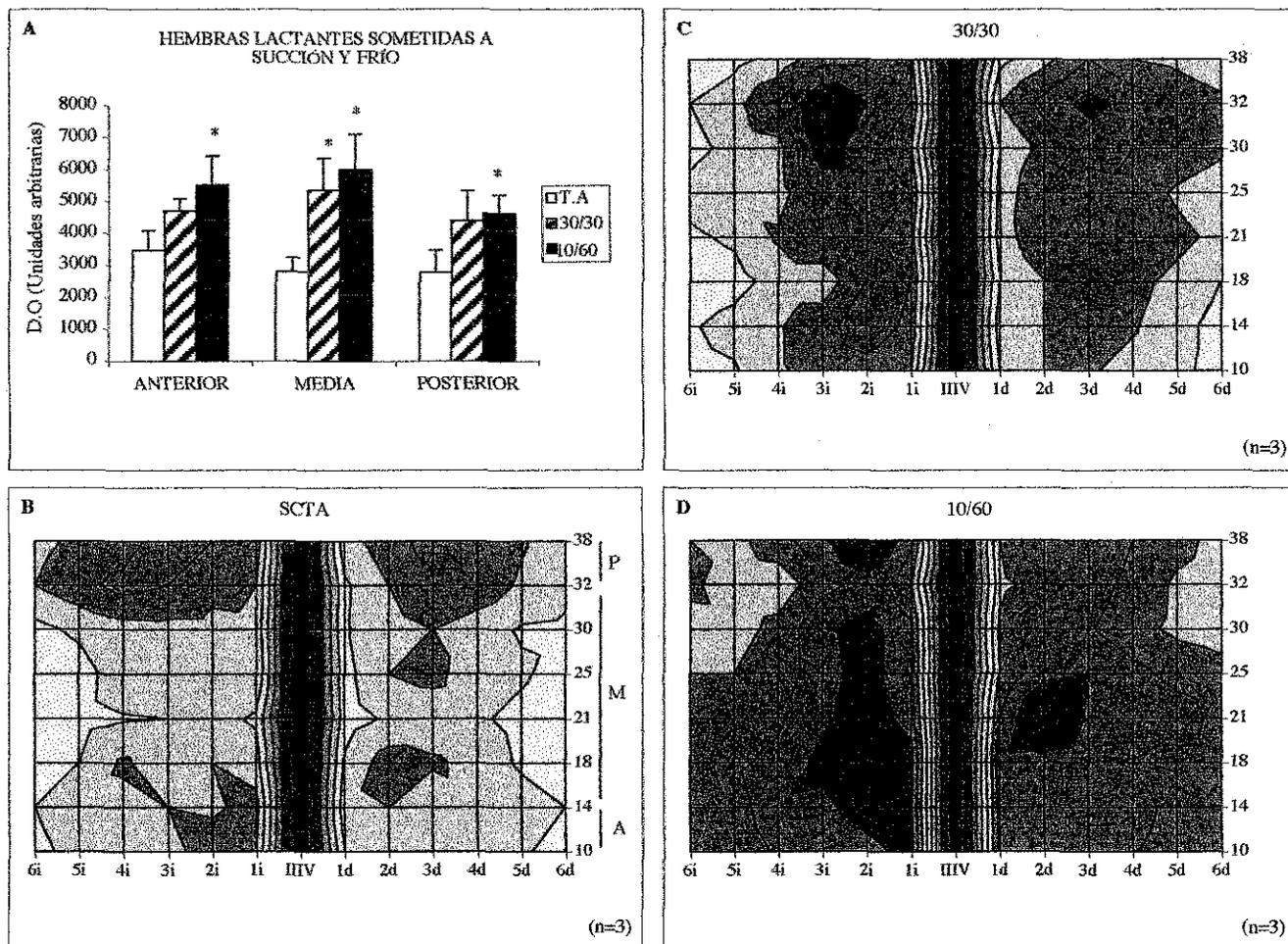


Figura 10. Expresión del RNAm de la TRH en el NPV de ratas lactantes expuestas a los estímulos de frío y de succión. Hembras lactantes separadas de sus crías por 8 hrs recibieron un estímulo de succión por 30 min seguido por 30 min de frío (30/30) o bien 10 min de succión seguido por 60 min de frío (10 / 60). La gráfica en A representa el valor promedio \pm esm de la señal total en el NPV analizado por zonas (* $p < 0.05$). Las gráficas en B, C y D muestran una vista panorámica de la señal del RNAm de la TRH en el NPV de los grupos señalados aplicando el análisis por celdas descrito en la figura 6.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

se señalan las fronteras entre las distintas zonas parvocelulares del PVN en la dirección rostro caudal (figura 2).

Si bien no podemos predecir con exactitud la región parvocelular (ap, pv, mp, dp o lp) en la que se activan las células que responden a los distintos estímulos, este sistema nos permite mapear de manera general las zonas parvocelulares en las que se concentran mayormente las células que responden a los estímulos de frío y/o de succión.

Como se puede apreciar en la **figura 11**, no hay una división anatómicamente clara entre las células que responden al estímulo del frío o al de la succión. La zona anterior de las lactantes estimuladas por frío muestra activación en una región que no corresponde al PVN periventricular, que se distribuye hacia la región parvocelular considerada como la zona anterior. La zona media del PVN presenta un mayor número de células que se activan cuando se estimula a las ratas durante la condición de sólo frío o en el estímulo combinado 10/60 que cuando se estimula por succión. En la región posterior se observan similitudes entre el patrón de distribución de las células que responden a 30 min de succión y el patrón de distribución de las células del grupo 10/60, mostrando con ello que 10 min de estimulación son suficientes para activar a la población TRHérgica que responde a la succión. No obstante, si comparamos los dos grupos combinados podemos apreciar que se requiere de una hora de exposición al frío para que la población TRHérgica que responde se active.

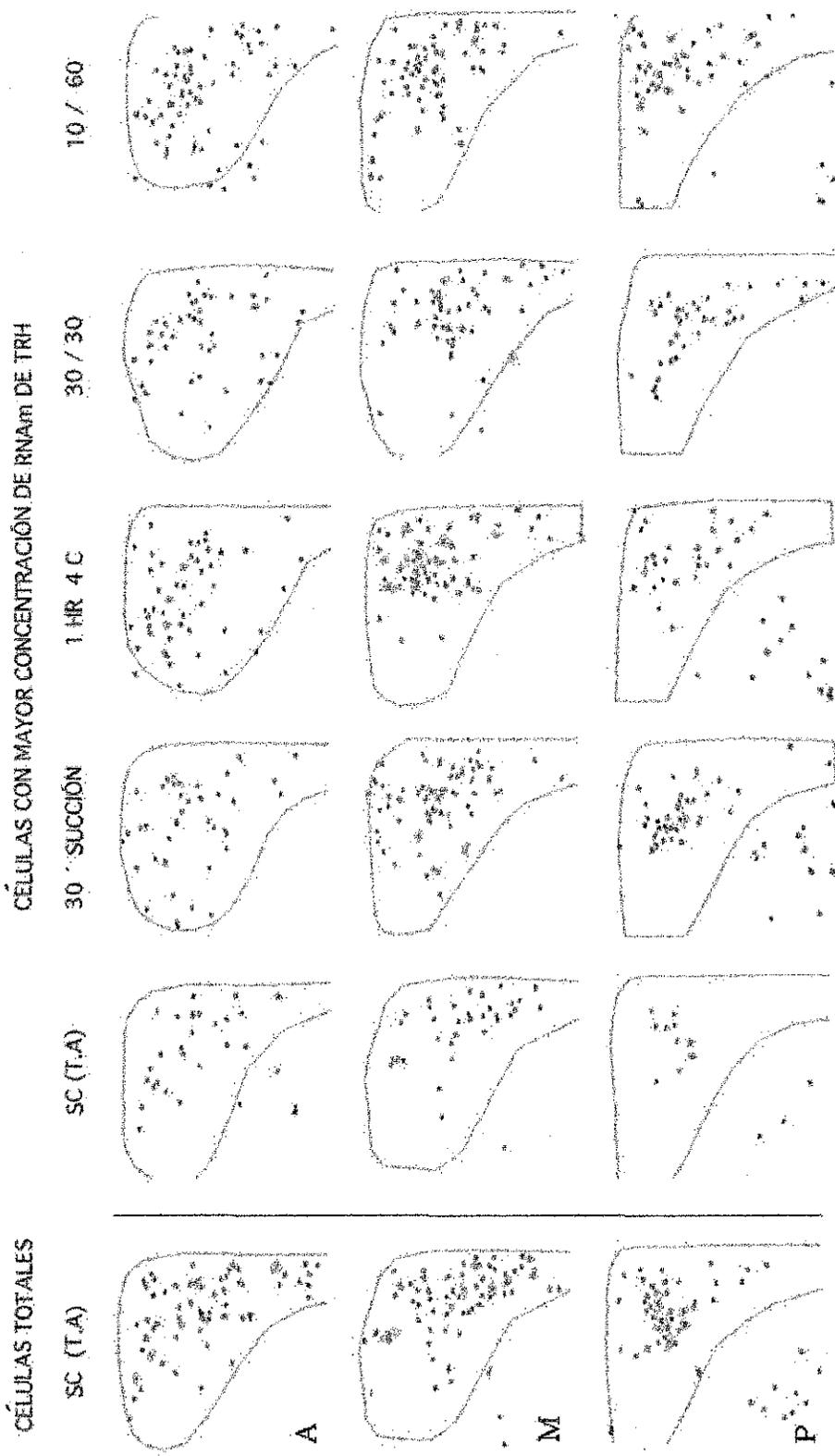


Figura 11. Mapas representativos de células TRHérgicas en el NPV de hembras lactantes sometidas a los estímulos de frío y/o succión. En la primera columna se presentan los mapas con todas las células TRHérgicas de animales sin cifras a temperatura ambiente: SC (T.A) en las zonas anterior (A), media (M) y posterior (P) del NPV. En la siguiente columna las mismas rebanadas conteniendo sólo a las células de mayor concentración. Las columnas restantes comparan el patrón de distribución de las células con mayor concentración entre los distintos grupos experimentales.

TELIS CCG
FALSA DE ORIGEN

DISCUSIÓN

Las neuronas parvocelulares de las zonas media y periventricular del PVN del hipotálamo sintetizan a la TRH que regula la síntesis y liberación de las hormonas TSH y prolactina de la glándula hipofisiaria. La TSH estimula la síntesis y liberación de las hormonas T3 y T4 de la glándula tiroidea que a su vez controlan al eje tiroideo de forma negativa tanto a nivel de la hipófisis como a nivel del hipotálamo. Este sistema retroalimentador está cuidadosamente protegido por mecanismos homeostáticos que residen tanto en el hipotálamo como en la hipófisis anterior de tal forma que existe una relación inversa entre los niveles circulantes de T3, T4 y la biosíntesis y secreción de la TRH y TSH [Rondeel, JM. y col.,1988,1992., Segerson, TP. y col.,1987., Koller, KJ. y col.,1987]. Sin embargo, en respuesta a estrés ambiental y bajo ciertas condiciones tanto patológicas como fisiológicas, el eje tiroideo reajusta rápidamente su nivel de respuesta a la hormona tiroidea para favorecer la sobrevivencia del organismo bajo condiciones adversas. Por ejemplo, la exposición al frío genera un aumento en los niveles de la hormona tiroidea, así como un incremento en la expresión del RNAm de la TRH en el PVN y secreción de TSH [Ishikawa, K. y col., 1984., Arancibia, S. y col., 1983., Zoeller, RT. y col.,1990., Uribe, RM. y col.,1993] como una respuesta adaptativa para incrementar la termogénesis.

Considerando que la población TRHérgica del PVN puede ser regulada de manera diferencial de acuerdo a las aferencias que existen [Liposits, Z. y col.,1987., Toni, R. y col.,1990., Diano, S. y col.,1998., Fekete,C. y col., 2000 (a,b)] y por el medio hormonal presente en condiciones fisiológicas específicas, se analizó la actividad de esta población en dos circunstancias en las que la expresión del RNAm de la TRH se modula rápidamente: estimulación por frío y estimulación por succión [Uribe, R.M. y col.,1993., Rage, F. y col., 1994.,van Haasteren, G.A.C. y col.,1996]. El emplear a la rata lactante como modelo experimental permitió determinar la distribución regional de las neuronas que responden al estímulo del frío o al estímulo de la succión en el PVN y realizar a la par la búsqueda de marcadores de la respuesta celular a estos dos estímulos con el fin de distinguir una población de la otra.

Los cambios hormonales observados en machos adultos, hembras vírgenes y hembras lactantes, mostraron que la respuesta de las neuronas TRHérgicas del PVN al estímulo del frío es parcialmente independiente de su medio hormonal. En la condición de lactancia, la

respuesta hormonal al frío fue mayor en las ratas que recibieron el estímulo después de haberles retirado a sus crías por un período de 8 hrs versus las que permanecieron todo el tiempo con sus crías. En ambos grupos se encontró activación del eje adrenal aunque hubo una diferencia notable en la magnitud de la respuesta: mientras que las ratas con crías (CC) aumentaron 2 veces su nivel de corticosterona en sangre, las ratas sin crías (SC) lo incrementaron 7 veces. Esta diferencia se atribuyó a que el nivel basal de corticosterona en sangre fue mayor en las ratas CC vs las ratas SC (al parecer, la presencia de las crías mantiene activado de forma constante al sistema adrenal [Walker, C.D. y col., 1992]. La atenuación de la respuesta del eje adrenal no parece ser exclusiva a los cambios en la retroalimentación por glucocorticoides, ésta también podría deberse a una modificación de los mecanismos neurales aferentes a nivel del hipotálamo ya que, aún con dosis masivas de glucocorticoides que disminuyen notablemente el RNAm de CRH en ratas vírgenes [Lightman, S.L., 1992], la respuesta al estrés en las ratas lactantes no se suprime, sólo se atenúa [Harbuz, M.S. y col., 1990]. Además, la liberación de ACTH debida a exposición a éter o nado forzado tampoco se suprime en ratas lactantes que han sido adrenalectomizadas [Walker, C.D., 1995] lo que sugiere que los cambios en las aferencias estimuladoras o inhibitoras que reciben las neuronas CRHérgicas del PVN también están implicados en la modulación de las respuestas en esta condición fisiológica. Los glucocorticoides podrían participar en la regulación del PVN a un nivel más distal. Se sabe por ejemplo que estos modulan de forma importante a las células catecolaminérgicas del tallo cerebral y que disminuyen la liberación de norepinefrina en el PVN en distintos grados, dependiendo del tipo de estrés [Pakak, K. y col., 1995]. La respuesta de los receptores α -1 adrenérgicos en las neuronas CRHérgicas también se encuentra disminuída durante la lactancia [Windle, R.J. y col., 1997].

Por otro lado, las hembras lactantes sometidas a estimulación aguda por frío, respondieron al estímulo incrementando los niveles de corticosterona y TSH en sangre pero no de PRL. Si bien es cierto que en condiciones normales el nivel de PRL en hembras vírgenes aumenta en respuesta a distintos tipos de estrés [Walker, CD. y col., 1992., Lightman, S.L. y Young, W.S., 1989], la respuesta a la exposición a éter o, por inmovilización, está atenuada durante la lactancia [Banky, Z. y col., 1994]; esto podría estar directamente relacionado con el mantenimiento de la producción de leche y cuidado de las crías que se requiere bajo la

condición de lactancia. En nuestros grupos experimentales, el nivel basal de PRL sólo se elevó en respuesta a la succión (tabla V).

Si bien el aumento en los niveles de la TSH circulante fue paralelo al aumento en la expresión del RNAm de la TRH de los machos y las hembras lactantes sometidos a frío, en las ratas vírgenes no fue posible hacer esta correlación en respuesta al mismo estímulo. La presencia de distintas concentraciones de estrógenos en los diferentes estadios del ciclo estral podría determinar en parte que los niveles de expresión del RNAm de la TRH en el PVN sean distintos en las hembras dependiendo de la etapa del ciclo [Uribe, R.M. y col., 1991]. Como las hembras vírgenes empleadas para estos experimentos se eligieron al azar (porque el interés primordial consistió en comparar la distribución del RNAm de la TRH entre hembras y machos), no se descarta la influencia de los estrógenos como uno de los factores que repercutieron en la variabilidad de la respuesta del RNAm de la TRH al estímulo del frío. En la actualidad, los estudios que se realizan en el laboratorio en respuesta al estímulo del frío, se hacen con hembras vírgenes cicladas.

Aún cuando el patrón de distribución de las neuronas TRHérgicas y el número de cortes que conforman al PVN de las hembras vírgenes o de las ratas lactantes no es idéntico al PVN del macho, se encontraron patrones anatómicos y de distribución similares, que permitieron hacer distintas comparaciones a lo largo del núcleo o a niveles específicos dentro del núcleo (anterior, medio y posterior).

El patrón de distribución tanto de machos como de lactantes sometidos a 1 hr de frío mostró que el aumento en la expresión del RNAm de la TRH se da a lo largo del núcleo, de rostral a caudal (figuras 6 y 8), esto sugirió, que si existen subpoblaciones que responden al frío, las neuronas no se segregan en zonas específicas del núcleo en la dirección antero-posterior. Además, la medición de la D.O. del RNAm por celdas mostró que los cambios se encuentran distribuidos entre las neuronas de todas las subdivisiones del PVN que sintetizan a la TRH, con mayor significancia entre los cortes de las regiones media y periventricular parvocelulares (figuras 6 b-c, 8 b-c y 8 e-f).

Tampoco se encontraron cambios entre el número total de células TRHérgicas de animales control y experimentales, sugiriendo con ello que la población preexistente incrementa su nivel basal de RNAm en respuesta al estímulo de frío. La respuesta podría estar confinada a

sólo una parte de la población ya que el número de células TRHérgicas con mayor concentración de RNAm en la condición estimulada conforma alrededor del 25 % de la población total. Estas células a las cuales llamamos "células que responden", se distribuyeron a lo largo del PVN tanto en los machos como en las lactantes y, como se observa en la figura 11, además de aparecer en la región periventricular del PVN parvocelular, la señal se extendió hacia una zona fuera de ésta en la parte rostral del núcleo. Por el patrón de distribución de las células TRHérgicas que responden y por la tinción misma de los cortes a ese nivel del PVN, es posible que se trate de las células que se localizan en la región parvocelular referida anatómicamente por Swanson, L.W., y Kuypers, H.G., 1980, como región anterior. Si bien las neuronas TRHérgicas de las zonas media y periventricular contribuyen a la inervación de la EM con una densidad mucho mayor de terminaciones que las neuronas TRHérgicas de la zona anterior [Ishikawa, K. y col.,1988], estas últimas también están siendo reguladas por el frío porque aumentan de forma significativa la expresión del RNAm de la TRH [Zoeller,RT. y col.,1990, 1995., este trabajo]. Es importante destacar que la región parvocelular anterior es una de las regiones del PVN cuyas terminales nerviosas inciden sobre el tallo cerebral y/o médula espinal por lo tanto, se sugiere que las neuronas TRHérgicas de esta zona podrían activarse como parte de la respuesta autónoma al frío.

Aún cuando la inervación aferente proveniente del rafé magno [Larsen P.J. y col.,1996] o del tallo cerebral [Ricardo y Koh., 1978, 1979., Swanson, L.W., y Kuypers, H.G., 1980] podría activar a las neuronas TRHérgicas de la zona parvocelular anterior en respuesta al frío, la ruta descendente seguida por esta población es incierta. Hay neuronas de esta zona que proyectan al complejo vago dorsal en el tallo cerebral así como a la médula oblongada y médula espinal, y conexiones recíprocas médula espinal -PVN, tallo -PVN [Swanson, L.W., y Kuypers, H.G., 1980]. Sin embargo, las neuronas TRHérgicas que residen en la zona anterior e incluso las neuronas TRHérgicas de otras zonas del PVN no parecen contribuir a la inervación de la médula espinal o del tallo cerebral ya que, ni la supresión electrolítica del PVN [Lechan, RM. y col., 1983] ni la transección de axones hipotalámicos descendentes hacia cerebro medio-diencefalo, reduce el contenido de la TRH en el núcleo del tracto solitario [Palkovits, M. y col.,1986]. Hay una inervación TRHérgica importante hacia el complejo vago (núcleo motor dorsal y núcleo del tracto solitario) pero ésta proviene del rafé [Palkovits, M. y col.,1986]. Por

otro lado, la mayor parte de la TRH encontrada en la médula espinal proviene de neuronas que la sintetizan en diferentes núcleos del rafe y, aunque hay neuronas AVP y OXT del PVN que inervan a la médula espinal [Swanson, L.W. y Sawchenko, P.E., 1980], ningún grupo celular del PVN que sintetice a la TRH, contribuye a la inervación hacia la médula espinal (Harkness, 1986). Es posible que las neuronas TRHérgicas de la zona anterior envíen información al sistema autónomo a través de relevos localizados en otros sitios dentro del SNC, por ejemplo, a regiones del cerebro implicadas en termoregulación. Tampoco se descarta la posibilidad de que las neuronas de la zona anterior estén regulando de forma indirecta la actividad del eje tiroideo, a través de contactos sinápticos sobre neuronas TRHérgicas del PVN [Toni, R. y col., 1990] o sobre otras poblaciones celulares como las CRHérgicas del PVN [Hisano, S. y col., 1993], que también están siendo moduladas en respuesta al estímulo [Zoeller, R.T. y col., 1995]; esto sin embargo, tendrá que ser analizado mediante el uso de marcadores retrógrados u otras metodologías que permitan distinguir una población de la otra.

El efecto de la succión sobre la expresión del RNAm de la TRH fue menor al observado en el grupo de frío SC, aún cuando la activación del eje adrenal fue similar en ambos (tabla V). No obstante, el aumento en la expresión del RNAm de la TRH, se observó preferencialmente en las zonas media y posterior del núcleo (figura 8I), hacia el PVN medio y periventricular parvocelulares (figura 11). Al igual que con la estimulación por frío, la población total de células TRHérgicas del PVN se mantuvo constante en respuesta a 30 min de succión, indicando de nuevo que la población preexistente incrementa su nivel de expresión de RNAm de la TRH en respuesta a la estimulación. La respuesta fue diferencial respecto al frío en el sentido que el número de células que respondieron, aumentó únicamente en las zonas media y posterior.

Las diferencias encontradas en las lactantes sometidas a frío o a succión, parecieran indicar que las neuronas TRHérgicas del PVN están subdivididas al menos en 2 tipos de poblaciones, la de la zona anterior desempeñando un papel neuromodulador y la de las zonas media y posterior controlando la función hipofisiotrófica al regular la liberación de las hormonas TSH y PRL. No obstante, esta estrategia no permitió distinguir si las neuronas de la zona media y posterior que responden al frío o a la succión son distintas o no. Por ello, además de mapear la distribución del RNAm de la TRH en todo el núcleo, se intentó identificar marcadores de la

respuesta celular al frío o a la succión. Un método ampliamente utilizado para mapear cambios en la actividad neuronal, es la medición de la expresión de genes tempranos inmediatos como *c-fos* [Morgan, J.I. y Curran, T., 1989., 1991., Sagar, S. y col., 1988].

El RNAm de *c-fos* colocalizó con el RNAm de la TRH de machos, hembras vírgenes y hembras lactantes que recibieron estimulación aguda por frío pero no colocalizó con el RNAm de la TRH en el PVN de las ratas sometidas a succión o las estimuladas por frío en presencia de sus crías. Otros grupos han medido a la proteína Fos en ratas lactantes y han encontrado que si bien existe alta inmunoreactividad a Fos en varios sitios del cerebro de madres que permanecen todo el tiempo con sus crías [Lonstein, J.S. y Stern, J.M., 1998], la inmunoreactividad en el PVN, núcleo supraóptico o núcleo arcuato no es mayor si las crías succionan a sus madres [Fenelon, V.S. y col., 1993]. El gen de *c-fos* tampoco cambia en la región parvocelular del PVN de ratas a mitad de la lactancia expuestas a estrés por inmovilización [Da costa A.P.C. y col., 1996] lo que indica que este gen temprano podría ser un marcador de la respuesta celular al estímulo del frío. La activación de *c-fos* en respuesta al frío, podría darse a través de una cascada de segundos mensajeros iniciada por un mecanismo adrenérgico [Annunziato, L. y col., 1977] proveniente del tallo cerebral [Swanson, L.W. y Sawchenko, P.E., 1980., Saper y Loewy, 1980] o de otras partes del SNC. Si bien las catecolaminas juegan un papel importante en la respuesta de la neurona TRHérgica al estímulo del frío a nivel de la terminal [Tapia-Arancibia, L. y col., 1985], la presencia de las catecolaminas a nivel de los somas [Liposits, Z. y col., 1987] plantea la posibilidad de una regulación a nivel del gen.

Aunque las lactantes que recibieron el estímulo agudo de frío mostraron un nivel de activación similar al de las hembras y los machos, el nivel basal de *c-fos* fue indetectable en el PVN de las ratas control. Estudios previos han mostrado que la expresión de *c-fos* en el PVN está reducida durante la lactancia y que la inmunoreactividad a Fos disminuye después del parto y permanece baja durante las 3 semanas del período de lactancia [Wintrip, N. y col., 1997]. Se sugiere que la disminución podría deberse en parte a los niveles altos de corticosterona en el plasma, ya que hembras lactantes adrenalectomizadas y sustituidas con niveles constantes de corticosterona, exhiben respuestas significativas a Fos [Wintrip, N. y col., 1997]. Es posible que durante la lactancia ocurran cambios importantes en las aferencias que inciden sobre el

PVN que puedan modificar la respuesta de las células al medio exterior. Los resultados mostraron que el RNAm de *c-fos* se induce en aproximadamente el 25% de las neuronas TRHérgicas del PVN de las ratas que respondieron al frío y que en todos los grupos la inducción se da a lo largo del PVN, en la dirección antero-posterior. Baffi, J.S. y Palkovits, M., 2000 demostraron que la inmunoreactividad a Fos incrementa en el PVN de machos expuestos al frío por 3 hrs y que las neuronas que responden se localizan únicamente en las zonas media y dorsal parvocelular del núcleo. Dado que la inmunoreactividad a Fos aumenta en el PVN desde 1hr de estimulación en otros modelos de estrés [Kovács, KJ. y Sawchenko, P.J., 1996], es posible que algunas de las neuronas de la zona anterior podrían haber mostrado inmunoreactividad a la proteína a tiempos previos. Si bien el porcentaje de colocación de *c-fos* con la TRH fue similar al encontrado para la población de células con mayor concentración de RNAm de la TRH en la condición estimulada, la metodología empleada para la doble hibridación no permitió predecir si se trataba de las mismas células o no. Al parecer el marcaje con *c-fos* fue indistinto sobre las células TRHérgicas que mostraron mucha o poca señal con dig, pero esto fue sólo cualitativo.

Se analizó el patrón de la proteína CREBP-P en las ratas succionadas pero no se detectó señal en el PVN antes o después del estímulo. En un paradigma similar al nuestro, Zoeller, RT [Sánchez, E. y col., 2001, artículo anexo] midió la expresión de otros genes tempranos (NGF1A, *fra-1* y *c-jun*) y encontró que ninguno de estos genes se activaba en respuesta al estímulo de la succión. Al no encontrar un marcador que se activara en las neuronas TRHérgicas del PVN en respuesta a la succión, se analizó tanto la expresión del gen de la TRH como el número de células total y de mayor concentración en ratas lactantes sometidas a ambos estímulos. Las ratas lactantes de este grupo, respondieron modulando su nivel de respuesta en el PVN de forma diferencial. Si bien el grupo que recibió 30 min de succión seguidos por 30 min de frío (30/30) mostró cierta activación en las neuronas de la zona anterior, el grupo que recibió 10 min de succión seguido por 60 de frío (10/60) tuvo una respuesta mayor en todos los análisis realizados. Es posible que las neuronas de la zona anterior se “sensibilicen” y respondan desde tiempos menores (30 min de frío) cuando se les reta con dos estímulos agudos distintos. Por otro lado, 10 min de succión parecieron ser suficientes para disparar la respuesta al estímulo en el grupo 10/60. En estas ratas, que

recibieron el tiempo completo de frío, la señal del RNAm se extendió a lo largo y ancho del PVN sugiriendo que más células están activas en respuesta a los estímulos (figura 10). De hecho al analizar el número de células con mayor concentración de RNAm de la TRH, se encontró que éste se duplicó o triplicó en los grupos combinados con respecto a los animales que recibieron los estímulos por separado. En los grupos combinados, el número total de células TRHérgicas también permaneció constante, apoyando la hipótesis de que la población preexistente es la que responde a la estimulación y no que nuevas células expresan al RNAm de la TRH en la condición estimulada. El efecto aditivo sobre la población de neuronas TRHérgicas con mayor concentración sugiere la existencia de subpoblaciones TRHérgicas en el PVN. Proponemos que las poblaciones que responden al frío y a la succión se encuentran entremezcladas porque el patrón de distribución de las células con mayor concentración de RNAm se sobrelapa en los grupos combinados en las mismas regiones del PVN que respondieron a los estímulos por separado (figura 11). Esta hipótesis se apoya en el hecho de que no todas las neuronas TRHérgicas de una misma población parvocelular son contactadas por las mismas aferencias. Mientras que la mayoría de las neuronas TRHérgicas de la zona anterior son contactadas por α -MSH, AGRP, NPY y escasamente por CART, las neuronas de las zonas media y periventricular presentan mayor variabilidad en las aferencias a estos mismos péptidos [Fekete, C. y col., 2000 (a y b), Toni, R. y col., 1990]. Además, las neuronas de estas dos últimas zonas son contactadas por aferencias catecolaminérgicas densas [Liposits, Z. y col., 1987] y por poblaciones peptídicas adicionales como el TRH mismo, el CRH y el péptido PACAP [Toni, R. y col., 1990., Kiss, J. y Halasz, B., 1990., Hisano, S. y col., 1993., Legradi, G. y col., 1997 (b)].

El hecho de que las neuronas TRHérgicas del PVN podrían ser anatómica y funcionalmente distintas sugiere una respuesta más eficaz por parte del eje tiroideo para contender con las distintas condiciones a las que se enfrenta el organismo tanto en condiciones fisiológicas específicas como en condiciones patológicas o de estrés. El grupo de Lechan, R.M. así como otros grupos de investigación están tratando de elucidar los mecanismos que regulan la respuesta del eje tiroideo ante la condición de ayuno así como las interacciones que ocurren entre el núcleo arcuato y el PVN bajo esta condición.

En general se desconocen las señales que actúan de forma independiente a los mecanismos normales de retroalimentación de la hormona tiroidea sobre las neuronas TRHérgicas del PVN y que reajustan la respuesta a la hormona en estas neuronas. Sin embargo, se ha propuesto que la leptina modula de forma fina al eje tiroideo. La leptina es una hormona sintetizada por las células grasas del tejido pardo, que está implicada en mediar la conservación de la energía [Caro, J.F. y col.,1996]. Esta hormona se reconoce como un factor de saciedad porque disminuye la ingesta de alimentos y, en su ausencia, se produce una obesidad severa [Zhang, Y. y col.,1994]. La relación entre leptina y la regulación del eje tiroideo por el cerebro no es clara. Sin embargo, la señal dominante y quizá suficiente para el cerebro, que suprime la expresión de la TRH en el PVN, es una caída en el nivel de leptina. En el ayuno, los niveles de leptina en sangre son bajos [Legradi, G. y col.,1997 (a)]. La administración de leptina en ratas sometidas a ayuno, reestablece tanto los niveles de RNAm de la TRH en el PVN como los niveles séricos de hormona tiroidea similar a lo observado en condiciones basales [Legradi, G. y col.,1997 (a)] lo que indica que la disminución de leptina en esta condición es necesaria para mantener disminuída la actividad del eje y por ende del metabolismo general. Si bien el efecto podría ser directo sobre las neuronas TRHérgicas del PVN, la población TRHérgica que presenta receptor a leptina es de apenas un 10% [Tartaglia, L.A. y col., 1995] y estudios de unión al receptor muestran que la hormona no se une al PVN [Schwartz, MW., 1996] aunque sí a la eminencia media [Banks, WA. y col.,1996], lo que podría implicar una regulación del péptido a nivel de la terminal. Se desconoce si las neuronas TRHérgicas presentan receptor a leptina en sus terminales.

La leptina parece actuar más bien de forma indirecta a través de distintas neuronas que responden a leptina que se comunican con la neurona TRHérgica desde otros núcleos hipotalámicos. La inervación del núcleo arcuato parece ser muy importante en mediar esta respuesta. Legradi, G. y col., en 1998, demostraron que la destrucción del núcleo arcuato evita la caída en los niveles de hormona tiroidea observada durante el ayuno y también la caída en los niveles de RNAm de la TRH en el PVN. NPY y AGRP se sintetizan en las mismas células del núcleo arcuato [Schutter., 1997] y ambos aumentan su expresión durante el ayuno [Hahn, TM. y col.,1998]. Como la acción de NPY y AGRP sobre las neuronas TRHérgicas del PVN es del tipo inhibitor [Toni, R. y col.,1990., Legradi, G. y col.,1999], se propone que la caída

en los niveles de leptina durante el ayuno facilita este efecto. No obstante, se desconoce por ejemplo si la población TRHérgica del PVN en general se modula en respuesta al ayuno o si existen poblaciones de neuronas que respondan de manera diferencial.

Aunado a las diferentes combinaciones aferentes que podrían recibir las neuronas TRHérgicas de una misma región parvocelular, es posible que un mismo péptido pueda modular la actividad de la neurona TRHérgica de forma opuesta, dependiendo del origen de la aferencia y del sitio en el que contacte a la neurona. Por ejemplo, la innervación de NPY proveniente del núcleo arcuato es del tipo inhibitorio y hace contacto con los somas [Toni, R. y col., 1990] mientras que la proveniente del tallo cerebral es del tipo excitador y contacta a las neuronas TRHérgicas del PVN en dendritas lejanas y husos dendríticos [Diano, S. y col., 1998]. Se desconoce si una misma neurona TRHérgica podría ser contactada a la vez por NPY proveniente del núcleo arcuato o del tallo cerebral.

Estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de Kim, M.S. y col., 2000 revelan la importancia de la vía de la melanocortina en mediar la respuesta nutricional de la neurona TRHérgica a leptina. La vía de la melanocortina implica a dos ligandos distintos que se unen a receptores MC1-R y MC4-R y que se expresan en poblaciones distintas en el núcleo arcuato. Los ligandos son AGRP que es suprimido por leptina (-) y α -MSH que es inducido por leptina (+). El MC4-R es estimulado por α -MSH e inhibido por AGRP de tal forma que el sistema puede ser antagonizado disminuyendo a α -MSH o aumentando a AGRP. Kim, M.S. demostró además, que α -MSH aumenta los niveles de TSH cuando se administra centralmente y también que α -MSH estimula la liberación de la TRH cuando se administra en rebanadas de hipotálamo por tanto, propone que AGRP bloquea la liberación de la TRH antagonizando la acción de α -MSH y oponiéndose a la acción de leptina. El efecto pudiera estar dado a nivel de los somas ya que las TRHérgicas del PVN presentan inmunoreactividad al MC4-R [Mountjoy, K.G. y col., 1994., Dumont, L.M. y col., 2001]. Dado que α -MSH evita la supresión del gen de la TRH inducida por el ayuno [Fekete, C. y col., 2000(a)], el sistema central de melanocortina podría jugar un papel importante en la regulación del eje tiroideo por leptina promoviendo contactos entre neuronas reguladas antagónicamente por leptina en el núcleo arcuato y neuronas TRHérgicas en el PVN. Aunado a esto, CART, que se sintetiza en las mismas células que expresan α -MSH en el núcleo arcuato actúa sobre la expresión del gen de la TRH de

manera positiva en ratas sometidas a ayuno [Fekete, C. y col., 2000(b)]. Si bien es posible que CART potencie la acción de α -MSH sobre las neuronas TRHérgicas del PVN, CART tampoco reestablece del todo el nivel de hormona tiroidea en sangre por lo que se sugiere que el péptido media sólo parte de los efectos de leptina sobre el eje tiroideo.

La lactancia y el ayuno son comparables en el sentido de que el estado tiroideo del animal se encuentra disminuído, el nivel de corticosterona en sangre es alto y el nivel circulante de leptina esta bajo [Brogan, R.S., 1997]. Si se administra leptina a las ratas lactantes, hay una disminución en la ingesta de alimentos que correlaciona con la pérdida de peso tanto de las madres como de las crías [Woodside, B. y col., 2000]. Esto podría significar, que al bajar los niveles de leptina, desaparece la regulación negativa sobre las neuronas AGRP/NPY del núcleo arcuato y aumenta entre otras cosas, la inervación de ambos hacia las neuronas del PVN que controlan al eje tiroideo con el fin de mantener disminuída su actividad. La disminución en los niveles de leptina también podría indicar la activación de otros sistemas hipotalámicos implicados en regular el apetito (p.e en el núcleo dorsomedial o en el mismo PVN).

Las neuronas TRHérgicas son susceptibles a cambios en el medio hormonal. La disminución del RNAm de la TRH observada durante el ayuno, se revierte parcialmente si los niveles de glucocorticoides se mantienen constantes en ratas adrenalectomizadas [Van Haasteren GAC. y col.,1995]. Sin embargo, esta condición no es suficiente para revertir los niveles de hormona tiroidea y apoya la hipótesis de que el medio hormonal es solo uno de los mecanismos que participan en la respuesta al estímulo.

La respuesta de la neurona ante una condición específica no sólo dependerá de las señales que reciba del exterior, también dependerá de la maquinaria celular que la conforme y las neuronas TRHérgicas del PVN parecen ser distintas a nivel celular. La heterogeneidad bioquímica de las neuronas TRHérgicas se infiere por estudios tanto *in vivo* como *in vitro*. Mientras que todas las neuronas parvocelulares de las zonas media y periventricular presentan al GC-R, sólo la mitad de las neuronas de la zona anterior lo contienen [Cintra, A. y col.,1990]. Adicionalmente, las neuronas de la zona media expresan a los receptores funcionales de hormona tiroidea α 1, β 1 y β 2(indispensable para la regulación negativa por T3) en proporciones que van del 80-90% mientras que el receptor truncado α 2 se expresa en el 43%

de las neuronas de la misma zona [Lechan, RM. y col.,1994]. Esto implicaría que en aproximadamente la mitad de las neuronas TRHérgicas de la zona media, el R- α 2 podría estar modulando la transducción de la señal para los receptores funcionales por unión inespecífica al ligando. Por otro lado, el 50% de las neuronas parvocelulares presenta al receptor MC4-R que une tanto α -MSH como AGRP y se sugiere que las mismas neuronas expresan receptores a NPY [Aschkenasi, CJ., 2000]. Si además se ha demostrado que distintas moléculas de señalización podrían interactuar con el GC-R y modular la expresión del RNAm de la TRH en forma distinta [Pérez-Martínez., L. y col., 1998], la respuesta de la neurona ante una condición específica podría depender de la presencia de los distintos receptores que ella sintetize y de las vías de señalización que estos utilicen.

Las convertasas PC1 y PC2 procesan de forma eficiente al precursor de la TRH tanto en preparaciones de membrana de vesículas hipofisarias [Friedman, TC. y col.,1995] como en líneas celulares [Nillni, EA. y col.,1995]. Ambas enzimas colocan con el RNAm de la TRH de manera diferencial dependiendo de la región del cerebro en la que se encuentren [Pu, L.P. y col., 1996] y, en el PVN, el 60% de la población contiene a la PC2 mientras que aproximadamente el 40% sintetiza a la PC1 [Sánchez, E. y col.,1997]. Si bien estas convertasas procesan al proTRH hasta sus productos finales (TRH y péptidos crípticos) es evidente que la velocidad de síntesis de las mismas enzimas así como su capacidad para procesar de manera rápida al precursor también repercutirá en la respuesta de la célula ante un estímulo dado.

Nillni, E.A. y col., en el 2001, demostraron que en la lactancia continua, el procesamiento del proTRH está aumentado en ratas sometidas a succión, lo cual correlaciona con el aumento en la biosíntesis de la TRH previamente reportado [Uribe, RM. y col.,1993., van Haasteren, GAC. y col.,1996., este trabajo]. Nillni, E.A. y col., también demostraron, que dos de los péptidos crípticos originados a partir del procesamiento del proTRH por la PC2 incrementan de forma significativa en el PVN de las ratas sometidas a succión y que ambos son capaces de aumentar la liberación de PRL pero no de TSH en cultivos primarios de células hipofisarias. Esto podría tener repercusiones fisiológicas importantes ya que mientras que uno de los productos de procesamiento que se genera junto con la TRH potencia la acción de la TRH sobre la liberación de TSH [Bulant, M. y col.,1990], estos otros péptidos podrían potenciar la

liberación de PRL por la TRH *in vivo*. El procesamiento diferencial del péptido podría depender de la actividad presente de una o varias enzimas. Resultados de este laboratorio han demostrado que el RNAm de la PC1 no aumenta en ratas lactantes sometidas a succión [Uribe, RM, no publicado] y si bien tanto el RNAm de la PC1 como el RNAm de la PC2 aumentan en el PVN (no sabemos si en las neuronas TRHérgicas) de ratas macho sometidos a 1hr de estrés por frío [Chávez, L., Morales, C, no publicado], resultados preliminares en ratas lactantes muestran que los mensajeros de ambas enzimas no parecen aumentar su expresión en las neuronas TRHérgicas del PVN en respuesta a 1hr de frío [Sánchez, E., en preparación]. A diferencia de la distribución que se observa en machos control a T.A., en donde tanto el RNAm de la PC1 como el de la PC2 son claramente visibles a lo largo del PVN, la expresión de ambos RNAs mensajeros en las lactantes que permanecen sin sus crías por 8 hrs (grupo SCTA), está disminuía. Durante la lactancia, el hipotálamo exhibe un grado excepcional de plasticidad neural. Las neuronas oxitocinérgicas tanto del PVN como del núcleo supraóptico por ejemplo, presentan una reorganización anatómica que incluye el remodelamiento sináptico entre la glía y las arborizaciones dendríticas [Montagnese. y col.,1987,1988; Theodosis, DT. y col., 1989; Fenelon, VS. y col.,1994] así como un aumento en la expresión de los receptores α -1 adrenérgicos y oxitocinérgicos [Hatton., G.I.,1997]. No es difícil pensar que bajo esta condición, las aferencias que recibe(n) alguna(s) subpoblacion(es) de neuronas TRHérgicas en el PVN, podría(n) ser modificadas aumentando o bien disminuyendo la sensibilidad a distintos sistemas neurotransmisores y peptídicos que repercutan en la actividad celular.

La heterogeneidad en la respuesta ya ha sido propuesta para otros neuropéptidos que se expresan en el PVN. El RNAm de CRH por ejemplo, se afecta diferencialmente en respuesta a solución salina y deshidratación incrementando su expresión en las neuronas magnocelulares y disminuyéndola en las parvocelulares del PVN en respuesta a choque salino y disminuyéndola su expresión en respuesta a deshidratación tanto en magno como en parvo [Young, W.S., 1986]. El RNAm de CRH también se regula de forma diferencial durante el ciclo estral. Su expresión aumenta en la tarde del proestro en la zona ventral del PVN y no se observan cambios aparentes en la parte dorsal del núcleo [Bohler, H.C. y col.,1990]. En otro modelo en donde se estudia la regulación de la expresión de OXT en el PVN, se demuestra que subdivisiones particulares del PVN responden de forma diferencial al tratamiento con T3 y

estradiol: mientras que en respuesta a estradiol el RNAm de OXT aumenta en las zonas parvocelular anterior y media del PVN, el tratamiento con T3 aumenta la expresión de OXT sólo en la subdivisión magnocelular posterior del PVN [Dellovade, T.L. y col.,1999]. En otro ejemplo, VIP aumenta los niveles de PRL, ACTH y GH en el plasma [Kato, Y. y col., 1978] y durante la lactancia incrementa la inervación de una población grande de neuronas del PVN parvocelular que se sabe proyecta a la lámina externa de la EM [Mezey, E. y Kiss, J.Z., 1985]. Además del PVN, otros núcleos hipotalámicos presentan heterogeneidad en la respuesta celular en condiciones particulares. NPY y AGRP, que normalmente se sintetizan en las neuronas de la parte rostral del núcleo arcuato, aumentan su expresión durante la lactancia continua, tanto en la parte media como en la caudal del núcleo y su expresión no se modifica en la parte rostral [Chen, P. y col.,1999]. Esto sugiere una posible regulación diferencial de las neuronas que sintetizan a ambos péptidos en el núcleo arcuato. La posibilidad de que ocurran cambios importantes en la inervación de las neuronas TRHérgicas del PVN por parte de estos péptidos también es factible. Es posible que las diferencias en el medio hormonal, así como el remodelamiento de las señales que inervan al PVN durante la lactancia, contribuyan de forma importante a la modulación diferencial de las respuestas observadas por el eje tiroideo en respuesta al frío y a la succión.

Nuestro trabajo contribuye al entendimiento de la función hipotalámica y sugiere una subespecialización de las neuronas que controlan la actividad del eje tiroideo en la condición fisiológica de la lactancia.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos con el presente trabajo concluimos lo siguiente:

- En la condición de lactancia, las neuronas TRHérgicas del PVN modulan su respuesta al frío y a la succión de forma diferencial.
- La población TRHérgica preexistente responde a los estímulos de frío o de succión.
- Si bien existen zonas en el PVN que se sobrelapan en respuesta al estímulo del frío o al de la succión, las neuronas que responden a los estímulos podrían ser distintas y estar entremezcladas a través del PVN tanto en la dirección antero-posterior como en el sentido central - lateral.
- Las neuronas TRHérgicas de la zona anterior podrían desempeñar un papel neuromodulador en la respuesta autónoma al frío.
- La expresión del gen temprano *c-fos* en el PVN, puede ser empleada como un marcador de la respuesta celular al estímulo del frío en la condición de lactancia.
- La proteína CREBP-P no es un indicador de actividad celular en respuesta al estímulo de la succión.

PERSPECTIVAS

La activación de distintas poblaciones TRHérgicas en el PVN en respuesta al estímulo del frío o de la succión, abre la posibilidad de caracterizar en estas poblaciones, a las moléculas efectoras implicadas en los mecanismos de respuesta a los estímulos en cuestión.

- Considerando que las neuronas TRHérgicas del PVN son inervadas de manera diferencial tanto por neurotransmisores como por neuropéptidos de distintos orígenes, la búsqueda de receptores específicos a un neurotransmisor o a un neuropéptido dado, podría ampliar nuestro conocimiento acerca de los elementos que participan en la modulación de la actividad de la neurona TRHérgica en la condición fisiológica de la lactancia, bajo un estímulo particular.
- La identificación de GC-R's o de las isoformas de los TH-R's en poblaciones específicas del PVN, también es importante para identificar a la maquinaria celular que participa de las respuestas al frío y/o a la succión en el modelo de lactancia.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos con el presente trabajo concluimos lo siguiente:

- En la condición de lactancia, las neuronas TRHérgicas del PVN modulan su respuesta al frío y a la succión de forma diferencial.
- La población TRHérgica preexistente responde a los estímulos de frío o de succión.
- Si bien existen zonas en el PVN que se sobrelapan en respuesta al estímulo del frío o al de la succión, las neuronas que responden a los estímulos podrían ser distintas y estar entremezcladas a través del PVN tanto en la dirección antero-posterior como en el sentido central - lateral.
- Las neuronas TRHérgicas de la zona anterior podrían desempeñar un papel neuromodulador en la respuesta autónoma al frío.
- La expresión del gen temprano *c-fos* en el PVN, puede ser empleada como un marcador de la respuesta celular al estímulo del frío en la condición de lactancia.
- La proteína CREBP-P no es un indicador de actividad celular en respuesta al estímulo de la succión.

PERSPECTIVAS

La activación de distintas poblaciones TRHérgicas en el PVN en respuesta al estímulo del frío o de la succión, abre la posibilidad de caracterizar en estas poblaciones, a las moléculas efectoras implicadas en los mecanismos de respuesta a los estímulos en cuestión.

- Considerando que las neuronas TRHérgicas del PVN son inervadas de manera diferencial tanto por neurotransmisores como por neuropéptidos de distintos orígenes, la búsqueda de receptores específicos a un neurotransmisor o a un neuropéptido dado, podría ampliar nuestro conocimiento acerca de los elementos que participan en la modulación de la actividad de la neurona TRHérgica en la condición fisiológica de la lactancia, bajo un estímulo particular.
- La identificación de GC-R's o de las isoformas de los TH-R's en poblaciones específicas del PVN, también es importante para identificar a la maquinaria celular que participa de las respuestas al frío y/o a la succión en el modelo de lactancia.

- ¿Cuál es la relevancia fisiológica de que las neuronas TRHérgicas de la zona anterior se activen en respuesta a la estimulación por frío?. La posibilidad de distinguir neuronas hipofisiotróficas por la coexpresión TRH – CART, junto con la identificación de receptores a neurotransmisores, neuropéptidos o, activación de genes tempranos, abre la posibilidad de identificar y de distinguir a las poblaciones TRHérgicas que participan como neurohormonas, de aquellas que participan como neuromoduladoras.
- La posibilidad de que el procesamiento del pro-TRH sea diferencial en el PVN de las ratas lactantes, apoya la importancia de caracterizar la expresión de los genes que codifican para las proteínas convertasas 1 y 2 en la condición de frío y de succión.
- El uso de los grupos combinados es una herramienta excelente para corroborar que las neuronas son distintas si previamente se han identificado genes que respondan de manera específica a un estímulo dado.

REFERENCIAS

- Adan RA, Oosterom J, Ludvigsdottir G, Brakkee JH, Burbach JP and Gispen WH. Identification of antagonists for melanocortin MC3, MC4 and MC5 receptors. *Eur J Pharmacol.* 1994; 269(3):331-7.
- Akdemir H, Pasaoglu A, Ozturk F, Selcuklu A, Koc K and Kurtsoy. Histopathology of experimental spinal cord trauma. Comparison of treatment with TRH, naloxone, and dexamethasone. *Res Exp Med (Berl).* 1992;192(3):177-83.
- Albert M, Jenike M, Nixon R and Nobel K. Thyrotropin response to thyrotropin-releasing hormone in patients with dementia of the Alzheimer type. *Biol Psychiatry.* 1993; 15:33(4):267-71.
- Almeida OF, Yassouridis A and Forgas-Moya I. Reduced availability of milk after central injections of corticotropin-releasing hormone in lactating rats. *Neuroendocrinology.* 1994; 59(1):72-7.
- Amico JA, Crowley RS, Insel TR, Thomas A and O'Keefe JA. Effect of gonadal steroids upon hypothalamic oxytocin expression. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 395: 23-35.
- Amir S. Stimulation of the paraventricular nucleus with glutamate activates interscapular brown adipose tissue thermogenesis in rats. *Brain Res.* 1990; 508(1):152-5.
- Annunziato L, Di Rezo G, Lombardi G, Scopacasa F, Schettini G, Preziosi P and Scapagnini U. The role of central noradrenergic neurons in the control of thyrotropin secretion in the rat. *Endo.* 1977; 100 (3): 738-744.
- Arancibia S, Rage F, Astier H and Tapia-Arancibia L. Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 257-267.
- Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I and Astier H. Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology.* 1983; 37(3):225-8.
- Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Astier H and Assenmacher I. Physiological evidence for alpha 1-adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci Lett.* 1989; 100(1-3):169-74.
- Aratan-Spire S, Scharfmann R, Lechan RM and Tashjian AH Jr. proTRH gene expression by fetal pancreatic islets in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 168(3):952-8.
- Argentin S, Ardati A, Tremblay S, Lihmann I, Robitaille L, Drouin J and Nemer M. Developmental stage-specific regulation of atrial natriuretic factor gene transcription in cardiac cells. *Mol Cell Biol.* 1994; 14(1):777-90.

- Baffi JS and Palkovits M. Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology*. 2000; 72(2):102-13.
- Bagnol D, Lu XY, Kaelin CB, Day HE, Ollmann M, Gantz I, Akil H, Barsh GS and Watson SJ. Anatomy of an endogenous antagonist: relationship between Agouti-related protein and proopiomelanocortin in brain. *J Neurosci*. 1999; 19(18):RC26.
- Balkan W, Tavianini MA, Gkonos PJ and Roos BA. Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology*. 1998; 139(1):252-9.
- Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB and Maness LM. Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin. *Peptides*. 1996;17(2):305-11.
- Banky Z, Nagy GM, and Halasz B. Analysis of pituitary prolactin and adrenocortical response to ether, formalin or restraint in lactating rats: rise in corticosterone, but no increase in plasma prolactin levels after exposure to estress. *Neuroendocrinology* 1994; 59 (1): 63-71.
- Barofsky AL, Taylor J and Massari VJ. Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology* 1983; 113(5):1894-903.
- Bealer SL and Crowley WR. Noradrenergic control of central oxytocin release during lactation in rats. *Am J Physiol*. 1998; 274(3 Pt 1):E453-8.
- Blake CA. Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rats. *Endocrinology*. 1974; 94(2):503-8.
- Bohler HC Jr, Zoeller RT, King JC, Rubin BS, Weber R and Merriam GR. Corticotropin releasing hormone mRNA is elevated on the afternoon of proestrus in the parvocellular paraventricular nuclei of the female rat. *Brain Res Mol Brain Res*. 1990; 8(3):259-62.
- Boudaba C, Szabo K and Tasker JG. Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurosci*. 1996; 16(22):7151-60.
- Brogan RS, Mitchell SE, Trayhurn P and Smith MS. Suppression of leptin during lactation: contribution of the suckling stimulus versus milk production. *Endocrinology* 1999; 140(6):2621-7.
- Bruhn TO, Bolduc TG, Rondeel JM and Jackson IM. Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. II. Stimulation by glucocorticoids. *Endocrinology* 1994; 134(2):821-5.
- Bruhn TO, Huang SS, Vaslet C and Nillni EA. Glucocorticoids modulate the biosynthesis and processing of prothyrotropin releasing-hormone (proTRH). *Endocrine*. 1998; 9(2):143-52.

Bulant M, Roussel JP, Astier H, Nicolas P and Vaudry H. Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide, prepro-TRH-(160-169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87(12):4439-43.

Carnell NE, Feng P and Kim UJ. Preprothyrotropin-releasing hormone mRNA and TRH are present in the rat heart. *Neuropeptides* 1992; 22: 209-212.

Caro JF, Sinha MK, Kolaczynski JW, Zhang PL and Considine RV. Leptin: the tale of an obesity gene. *Diabetes.* 1996; 45(11):1455-62.

Carr FE, Fein HG, Fisher CU, Wessendorf MW and Smallridge RC. A cryptic peptide (160-169) of thyrotropin-releasing hormone prohormone demonstrates biological activity in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1992; 131(6):2653-8.

Chen P, Li C, Haskell-Luevano C, Cone RD and Smith MS. Altered expression of agouti-related protein and its colocalization with neuropeptide Y in the arcuate nucleus of the hypothalamus during lactation. *Endocrinology* 1999; 140(6):2645-50.

Chen X and Herbert J. Regional changes in c-fos expression in the basal forebrain and brainstem during adaptation to repeated stress: correlations with cardiovascular, hypothermic and endocrine responses. *Neuroscience* 1995; 64(3):675-85.

Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T and Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.* 1988; 54(4):541-52.

Chowdrey HS, Jessop DS and Lightman SL. Substance P stimulates arginine vasopressin and inhibits adrenocorticotropin release in vivo in the rat. *Neuroendocrinology* 1990; 52(1):90-3.

Cintra A, Fuxe K, Wikstrom AC, Visser T and Gustafsson JA. Evidence for thyrotropin-releasing hormone and glucocorticoid receptor-immunoreactive neurons in various preoptic and hypothalamic nuclei of the male rat. *Brain Res.* 1990; 506(1):139-44.

Clemens JA and Shaar CJ. Control of prolactin secretion in mammals. *Fed Proc.* 1980; 39(8):2588-92.

Cockle SM and Smyth DG. Specific processing of the thyrotropin-releasing prohormone in rat brain and spinal cord. *Eur J Biochem.* 1987; 165(3):693-8.

Crowley WR, Shyr SW, Kacsóh B and Grosvenor CE. Evidence for stimulatory noradrenergic and inhibitory dopaminergic regulation of oxytocin release in the lactating rat. *Endocrinology* 1987; 121(1):14-20.

Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H and Watson SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 1995; 64(2):477-505.

Cunningham ET Jr and Sawchenko PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1988; 274(1):60-76.

Curran T and Franza BR Jr. Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell.* 1988; 55(3):395-7.

Curran T, Gordon MB, Rubino KL and Sambucetti LC: Isolation and characterization of the c-fos(rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* 1987; 2(1):79-84.

Da Costa APC, Wood S, Ingram CD, and Lightman SL. Region-specific reduction in stress-induced c-fos mRNA expression during pregnancy and lactation. *Brain Research* 1996; 742: 177-184.

de Greef WJ and Visser TJ. Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocrinol.* 1981; 91(2):213-23.

de Greef WJ, Voogt JL, Visser TJ, Lamberts SW and van der Schoot P. Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology.* 1987; 121(1):316-22.

Dellovade TL, Zhu YS and Pfaff DW. Thyroid hormones and estrogen affect oxytocin gene expression in hypothalamic neurons. *J Neuroendocrinol.* 1999; 11(1):1-10.

Demarest KT, McKay DW, Riegler GD and Moore KE. Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology* 1983; 36(2):130-7.

Diano S, Naftolin F, Goglia F and Horvath TL. Segregation of the intra- and extrahypothalamic neuropeptide Y and catecholaminergic inputs on paraventricular neurons, including those producing thyrotrophin-releasing hormone. *Regul Pept.* 1998; 75-76:117-26.

Dolan DH, Nichols MF, Fletcher D, Schadt JC and Zoeller RT. Cold and ethanol-induced hypothermia reduces cellular levels of mRNA encoding thyrotrophin-releasing hormone in neurons of the preoptic area. *Mol. Cell. Neurosci.* 1992; 3:425-432.

Dumont LM, Wu CS, Aschkenasi CJ, Elmquist JK, Lowell BB and Mountjoy KG. Mouse melanocortin-4 receptor gene 5'-flanking region imparts cell specific expression in vitro. *Mol Cell Endocrinol.* 2001; 184(1-2):173-85.

Duthie SM, Taylor PL, Anderson L, Cook J and Eidne KA. Cloning and functional characterisation of the human TRH receptor. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993; 95: R11-R15.

Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paull WK, Kaplan MM, Wu P, Jackson IM and Lechan RM. Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1988; 123(5):2291-7.

Evans RM and Hollenberg SM. Cooperative and positional independent trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1988; 53 Pt 2:813-8.

Fekete C, Legradi G, Mihaly E, Tatro JB, Rand WM and Lechan RM. alpha-Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett*. 2000 (a); 289(2):152-6.

Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH, Jackson IM and Lechan RM. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci*. 2000 (b); 20(24):9224-34.

Fenelon VS, Poulain DA, and Theodosis DT. Oxytocin neuron activation and fos expression: A quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neuroscience* 1993; 53 (1): 77-89.

Feng P, Li QL, Satoh T and Wilber JF. Ligand (T3) dependent and independent effects of thyroid hormone receptors upon human TRH gene transcription in neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 200(1):171-7.

Feng, P, Gu J and Kim UJ. Identification, localization and developmental studies of rat prepro thyrotropin-releasing hormone mRNA in the testis. *Neuropeptides* 1993; 24:63-69.

Frawley LS, Leong DA and Neill JD. Oxytocin attenuates TRH-induced TSH release from rat pituitary cells. *Neuroendocrinology*. 1985; 40(3):201-4.

Friedman TC, Loh YP, Cawley NX, Birch NP, Huang SS, Jackson IMD, and Nillni EA. Processing of prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes. *Endocrinology* 1995; 136: 4462-4472.

Gallo RV, Rabii J and Moberg GP. Effect of methysergide, a blocker of serotonin receptors, on plasma prolactin levels in lactating and ovariectomized rats. *Endocrinology* 1975; 97(5):1096-105.

Griffiths EC and Bennett JR., eds. 1983. *Thyrotropin -Releasing Hormone*. Raven Press, New York.

Grosvenor CE and Mena F. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology*. 1980; 107(4):863-8.

Grosvenor CE and Whitworth N. Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. *J Dairy Sci*. 1974; 57(8):900-4.

Grosvenor CE, Whitworth NS and Mena F. Evidence that the depletion and release phases of prolactin secretion in the lactating rat have different activation thresholds in response to exteroceptive stimulation from rat pups. *Endocrinology*. 1981; 108(3):820-4.

Guillemin R. Hypothalamic control of concomitant secretion of ACTH and TSH. *Proc R Soc Med*. 1967; 60(9):903

Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG and Schwartz MW. Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*. 1998; 1(4):271-2.

Harbuz MS, Nicholson SA, Gillham B and Lightman SL. Stress responsiveness of hypothalamic corticotrophin-releasing factor and pituitary pro-opiomelanocortin mRNAs following high-dose glucocorticoid treatment and withdrawal in the rat. *J Endocrinol*. 1990; 127(3):407-15.

Harkness DH and Brownfield MS. Segmental distribution of thyrotropin releasing hormone in rat spinal cord. *Brain Res Bull*. 1986; 17(1):11-9.

Hatton GI. Function-related plasticity in hypothalamus. *Annu Rev Neurosci*. 1997; 20:375-97.

Herman JP, Cullinan WE, Young EA, Akil H and Watson SJ. Selective forebrain fiber tract lesions implicate ventral hippocampal structures in tonic regulation of paraventricular nucleus corticotropin-releasing hormone (CRH) and arginine vasopressin (AVP) mRNA expression. *Brain Res*. 1992; 592 (1-2): 228-38.

Herman JP, Wiegand SJ and Watson SJ. Regulation of basal corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus: effects of selective hypothalamic deafferentations. *Endocrinology*. 1990; 127(5):2408-17.

Hisano S, Fukui Y, Chikamori-Aoyama M, Aizawa T and Shibasaki T. Reciprocal synaptic relations between CRF-immunoreactive- and TRH-immunoreactive neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res*. 1993; 620(2):343-6.

Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O and Wondisford FE. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*. 1995; 9(5):540-50.

Hough LB. Cellular localization and possible functions for brain histamine: recent progress. *Prog Neurobiol*. 1988; 30(6):469-505.

Ishikawa K, Taniguchi Y, Inoue K, Kurosumi K and Suzuki M. Immunocytochemical delineation of thyrotrophic area: origin of thyrotropin-releasing hormone in the median eminence. *Neuroendocrinology* 1988; 47(5):384-8.

Ishikawa K, Kakegawa T and Suzuki M: Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in the secretion of thyrotropin under adrenergic and cold-stimulated conditions in the rat. *Endocrinology* 1984; 114(2):352-8.

Jessop DS, Chowdrey HS, Larsen PJ and Lightman SL. Substance P: multifunctional peptide in the hypothalamo-pituitary system? *J Endocrinol.* 1992; 132(3):331-7.

Jingami H, Matsukura S, Numa S and Imura H. Effects of adrenalectomy and dexamethasone administration on the level of prepro-corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamus and adrenocorticotropin/beta-lipotropin precursor mRNA in the pituitary in rats. *Endocrinology* 1985; 117(4):1314-20.

Joseph-Bravo P, Uribe RM, Vargas MA, Perez-Martinez L, Zoeller T and Charli JL. Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol.* 1998; 18(2):231-47.

Kakucska I, Qi Y and Lechan RM. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1995; 136(7):2795-802.

Kato Y, Iwasaki Y, Iwasaki J, Abe H, Yanaihara N and Imura H. Prolactin release by vasoactive intestinal polypeptide in rats. *Endocrinology* 1978; 103(2):554-8.

Khan A, Lai H, Ukai Y and Mirolo MH. NS-3, a TRH analog, reverses repeated ECS induced deficits in water maze performance in the rat. *Pharmacol Biochem Behav.* 1994; 47(3):477-81.

Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edwards CM, Abusnana S, Sunter D, Ghatei MA and Bloom SR. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thyroid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest.* 2000; 105(7):1005-11.

Kiss J and Halasz B. Ultrastructural analysis of the innervation of TRH-immunoreactive neuronal elements located in the periventricular subdivision of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Brain Res.* 1990; 532(1-2):107-14.

Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U, Moller M and Warberg J. Histamine stimulates c-fos expression in hypothalamic vasopressin-, oxytocin-, and corticotropin-releasing hormone-containing neurons. *Endocrinology* 1994 (a); 134(1):482-91.

Kjaer A, Larsen PJ, Knigge U and Warberg J. Histaminergic activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology.* 1994 (b); 135(3):1171-7.

Knigge U and Warberg J. The role of histamine in the neuroendocrine regulation of pituitary hormone secretion. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991; 124(6):609-19.

- Koller KJ, Wolff RS, Warden MK and Zoeller RT. Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing-hormone mRNA in the paraventricular nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(20): 7329-33.
- Kordon C, Blake CA, Terkel J and Sawyer CH. Participation of serotonin-containing neurons in the suckling-induced rise in plasma prolactin levels in lactating rats. *Neuroendocrinology* 1973; 13(4):213-23.
- Kovacs KJ and Sawchenko PE. Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 1996;16(1) :262-73.
- Lafer B, Fava M, Hammerness P and Rosenbaum JF. The influence of DST and TRH test administration on depression assessments: a controlled study. *Biol Psychiatry*. 1993; 34(9):650-3.
- Larsen PJ, Hay-Schmidt A and Mikkelsen JD. Efferent connections from the lateral hypothalamic region and the lateral preoptic area to the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol*. 1994; 342(2):299-319.
- Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N and Mikkelsen JD. 1996. Origin of projections from the midbrain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: a combined retrograde and anterograde tracing study. *Neurosci*. 70(4): 963-988.
- Larsen PJ, Moller M and Mikkelsen JD. 1991. Efferent projections from the periventricular and medial parvicellular subnuclei of the hypothalamic paraventricular nucleus to circumventricular organs of the rat. A *Phaseolus vulgaris*-leucoagglutinin (PHA-L) tracing study. *J. Comp. Neurol*. 306: 462-480.
- Lechan RM, Qi Y, Jackson IM and Mahdavi V. Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1994; 135(1):92-100.
- Lechan RM, Snapper SB and Jackson IM. Evidence that spinal cord thyrotropin-releasing hormone is independent of the paraventricular nucleus. *Neurosci Lett*. 1983; 23;43(1):61-5.
- Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G and Goodman RH: Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 1986 (a); 231(4734):159-61.
- Lechan RM, Wu P and Jackson IM. Immunolocalization of the thyrotropin-releasing hormone prohormone in the rat central nervous system. *Endocrinology* 1986 (b); 119(3):1210-6.
- Lee GC, Yang IM, Kim BJ, Woo JT, Kim SW, Kim JW, Kim YS and Choi YK. Identification of glucocorticoid response element of the rat TRH gene. *Korean J Intern Med*. 1996; 11(2):138-44.

Lee SL, Stewart K and Goodman RH. Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem.* 1988; 263(32):16604-9.

Lee SL, Sevarino K, Roos BA and Goodman RH. Characterization and expression of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Ann N Y Acad Sci.* 1989; 553:14-28.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS and Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997 (a); 138(6): 2569-2576.

Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS and Lechan RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1998; 68(2):89-97.

Legradi G, Hannibal J and Lechan RM. Association between pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus. *J Chem Neuroanat.* 1997 (b); 13(4):265-79.

Legradi G, Holzer D, Kapcala LP and Lechan RM. Glucocorticoids inhibit stress-induced phosphorylation of CREB in corticotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1997 (c); 66(2):86-97.

Legradi G and Lechan RM. Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1999; 140(8):3643-52.

Li C, Chen P and Smith MS. Neural populations in the rat forebrain and brainstem activated by the suckling stimulus as demonstrated by cFos expression. *Neuroscience* 1999; 94(1):117-29.

Lind RW, Van Hoesen GW and Johnson AK. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J Comp Neurol.* 1982; 210(3):265-77.

Lightman SL and Young WS 3rd. Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone and oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 1989; 124(5):2358-64.

Lightman SL. Alterations in hypothalamic-pituitary responsiveness during lactation. *Ann NY Acad Sci.* 1992; 652:340-346.

Lin SH, Miyata S, Matsunaga W, Kawarabayashi T, Nakashima T, and Kiyohara T. Metabolic mapping of the brain in pregnant, parturient and lactating rats using fos immunohistochemistry. *Brain Research* 1998; 787: 226-236.

Liposits Z, Paull WK, Wu P, Jackson IM and Lechan RM. Hypophysiotrophic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons. Ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action. *Histochemistry* 1987; 88(1):1-10.

Lonstein JS and Stern JM. Somatosensory contributions to c-fos activation within the caudal periaqueductal gray of lactating rats: effects of perioral, rooting, and suckling stimuli from pups. *Horm Behav.* 1997; 32(3):155-66.

Luo LG, Bruhn T and Jackson IM. Glucocorticoids stimulate thyrotropin-releasing hormone gene expression in cultured hypothalamic neurons. *Endocrinology* 1995; 136(11):4945-50.

Martinez M, Phillips PJ and Herbert J. Adaptation in patterns of c-fos expression in the brain associated with exposure to either single or repeated social stress in male rats. *Eur J Neurosci.* 1998; 10(1):20-33.

Maue RA, Kraner SD, Goodman RH and Mandel G. Neuron-specific expression of the rat brain type II sodium channel gene is directed by upstream regulatory elements. *Neuron.* 1990; 4(2):223-31.

McGivern RF, Rittenhouse P, Aird F, Van de Kar LD and Redei E. Inhibition of stress-induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat by prepro-thyrotropin-releasing hormone 178-199. *J Neurosci.* 1997; 17(12):4886-94.

Merchenthaler I and Liposits Z. Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biol Hung.* 1994; 45(2-4):361-74.

Meites J and Nicoll CS. Adenohypophysis: prolactin. *Annu Rev Physiol.* 1966; 28:57-88.

Melia KR, Ryabinin AE, Schroeder R, Bloom FE and Wilson MC. Induction and habituation of immediate early gene expression in rat brain by acute and repeated restraint stress. *J Neurosci.* 1994; 14(10):5929-38.

Mezey E and Kiss JZ. Vasoactive intestinal peptide-containing neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(1):245-7.

Mihaly E, Fekete C, Legradi G and Lechan RM. Hypothalamic dorsomedial nucleus neurons innervate thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* 2001; 891(1-2):20-31.

Miselis RR. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res.* 1981; 230(1-2):1-23.

Montagnese CM, Poulain DA, Vincent JD and Theodosis DT. Synaptic and neuronal-glia plasticity in the adult oxytocinergic system in response to physiological stimuli. *Brain Res Bull.* 1988; 20(6):681-92.

Montagnese CM, Poulain DA, Vincent JD and Theodosis DT. Structural plasticity in the rat supraoptic nucleus during gestation, post-partum lactation and suckling-induced pseudogestation and lactation. *J Endocrinol.* 1987; 115(1):97-105.

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB and Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(10):1298-308.

Morgan JI and Curran T. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.* 1989; 12(11):459-62.

Morgan JI and Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu Rev Neurosci.* 1991;14:421-51.

Morley JE. Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr Rev.* 1981; 2(4):396-436.

Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, Simerly RB and Cone RD. Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol.* 1994; 8(10):1298-308.

Necker R, Wegner L and Krause D. Neural pathways for transmission of thermal information: The role of the raphe nuclei; En: Heller, W.C., Musacchia, X.J., Wang, L. (eds): *Living in the cold: Physiological and Biochemical adaptations.* 1986. Amsterdam, Elsevier. Pp:159-166.

Nemeroff CB and Evans DL. Correlation between the dexamethasone suppression test in depressed patients and clinical response. *Am J Psychiatry.* 1984; 141(2):247-9.

Nillni EA, Luo LG, Jackson IM and McMillan P. Identification of the thyrotropin-releasing hormone precursor, its processing products, and its coexpression with convertase 1 in primary cultures of hypothalamic neurons: anatomic distribution of PC1 and PC2. *Endocrinology* 1996; 137(12):5651-61.

Nillni EA, Aird F, Seidah G, Todd RB, and Koenig JI. PreproTRH178-199 and two novel peptides (pFQ7 and pSE14) derived from its processing, which are produced in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus, are regulated during suckling. *Endocrinology* 2001; 142(2): 896-906.

Nillni EA, Friedman TC, Todd RB, Birch NP, Loh YP, and Jackson IMD. Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1. *Journal of neurochemistry* 1995; 65: 2462-2472.

Nissenson R, Fluoret G and Hechter O. Opposing effects of estradiol and progesterone on oxytocin receptors in rabbit uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; 75(4):2044-8.

Numan M and Numan MJ. Expression of Fos-like immunoreactivity in the preoptic area of maternally behaving virgin and postpartum rats. *Behav Neurosci.* 1994; 108(2):379-94.

Numan M and Numan MJ. Importance of pup-related sensory inputs and maternal performance for the expression of Fos-like immunoreactivity in the preoptic area and ventral bed nucleus of the stria terminalis of postpartum rats. *Behav Neurosci.* 1995; 109(1):135-49.

Pakak K, Palkovits M, Kopin IJ and Goldstein DS. Stress induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: In vivo microdialysis studies, *Front Neuroendo.* 1995; 16: 89-150.

Palkovits M and Brownstein MJ. *Maps and guide to microdissection of the rat brain.* Elsevier Science Publishing, 1988.

Palkovits M, Mezey E, Eskay RL and Brownstein MJ. Innervation of the nucleus of the solitary tract and the dorsal vagal nucleus by thyrotropin-releasing hormone-containing raphe neurons. *Brain Res.* 1986; 373(1-2):246-51.

Palkovits M, Zaborszky L, Feminger A, Mezey E, Fekete MI, Herman JP, Kanyicska B and Szabo D. Noradrenergic innervation of the rat hypothalamus: experimental biochemical and electron microscopic studies. *Brain Res.* 1980; 191(1):161-71.

Perez-Martinez L, Carreon-Rodriguez A, González-Aizati ME, Morales C, Charli JL and Joseph-Bravo P. Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 1998; 68: 345- 54

Peterson RP. Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1966; 128(2):181-90.

Pu LP, Ma W, Barker JL, and Loh YP. Differential coexpression of genes encoding prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) and prohormone convertases (PC1 and PC2) in rat brain neurons: Implications for differential processing of pro-TRH. *Endocrinology* 1996; 137: 1233-1241.

Rage F, Lazaro JB, Benyassi A, Arancibia S and Tapia-Arancibia L. Rapid changes in somatostatin and TRH mRNA in whole rat hypothalamus in response to acute cold exposure. *J Neuroendocrinol.* 1994; 6(1):19-23.

Redei E, Hilderbrand H and Aird F. Corticotropin release inhibiting factor is encoded within prepro-TRH. *Endocrinology* 1995; 136(4):1813-6.

Reichlin S. Neural functions of TRH. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 1986; 276:21-33.

Ren Y, Satoh T, Yamada M, Hashimoto K, Konaka S, Iwasaki T and Mori M. Stimulation of the preprothyrotropin-releasing hormone gene by epidermal growth factor. *Endocrinology* 1998; 139(1):195-203.

- Renming X, Ishihara K, Sasa M, Ujihara H, Momiyama T, Fujita Y, Todo N, Serikawa T, Yamada J and Takaori S. Antiepileptic effects of CNK-602A, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on absence-like and tonic seizures of spontaneously epileptic rats. *Eur J Pharmacol.* 1992; 223(2-3):185-92.
- Ricardo JA and Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res.* 1978; 153(1):1-26.
- Rondeel JM, de Greef WJ, Klootwijk W and Visser TJ. Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* 1992; 130(2):651-6.
- Rondeel JM, de Greef WJ, van der Schoot P, Karels B, Klootwijk W and Visser TJ. Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 1988; 123(1):523-7
- Roussel JP, Teresi S, Vaudry H and Astier H. A cryptic peptide of TRH prohormone inhibits TRH-induced GH release. *C R Acad Sci III.* 1994; 317(3):270-6.
- Ryabinin AE, Melia KR, Cole M, Bloom FE and Wilson MC. Alcohol selectively attenuates stress-induced c-fos expression in rat hippocampus. *J Neurosci.* 1995 Jan; 15(1 Pt 2):721-30.
- Sagar SM, Sharp FR and Curran T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science.* 1988; 240(4857):1328-31.
- Sanchez E, Charli JL, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P and Uribe RM. Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res.* 1997; 761(1):77-86.
- Saper CB and Loewy AD. Efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.* 1980;197(2):291-317.
- Sapolsky RM, Armanini MP, Sutton SW and Plotsky PM. Elevation of hypophysial portal concentrations of adrenocorticotropin secretagogues after fornix transection. *Endocrinology.* 1989; 125(6):2881-7.
- Satoh T, Yamada M, Iwasaki T and Mori M. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *J Biol Chem.* 1996; 271(44):27919-26.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Grzanna R, Howe PR, Bloom SR and Polak JM. Colocalization of neuropeptide Y immunoreactivity in brainstem catecholaminergic neurons that project to the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1985; 241(2):138-53.

Sawchenko PE, Swanson LW and Joseph SA. The distribution and cells of origin of ACTH(1-39)-stained varicosities in the paraventricular and supraoptic nuclei. *Brain Res.* 1982; 232(2):365-74.

Sawchenko PE and Swanson LW. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science.* 1981; 214(4521):685-7.

Sawchenko PE and Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol.* 1983; 218(2):121-44.

Schagen FH, Knigge U, Kjaer A, Larsen PJ and Warberg J. Involvement of histamine in suckling-induced release of oxytocin, prolactin and adrenocorticotropin in lactating rats. *Neuroendocrinology* 1996; 63(6):550-8.

Schally AV, Redding TW, Bowers CY and Barrett JF. Isolation and properties of porcine thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem.* 1969; 244(15):4077-88.

Schaner P, Todd RB, Seidah NG and Nillni EA. Processing of prothyrotropin-releasing hormone by the family of prohormone convertases. *J Biol Chem.* 1997; 272(32):19958-68.

Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H and Ruat M. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev.* 1991; 71(1):1-51.

Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IM and Lechan RM. Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* 1987 (a); 238(4823):78-80.

Segerson TP, Heinz H, Childers H, Wlfe HJ, Wu P, Jackson IMD, and Lechan RM. Localization of Thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by in situ hybridization. *Endocrinology* 1987; 121 (1): 98-107.

Sevarino KA, Goodman RH, Spiess J, Jackson IM and Wu P. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor processing. Characterization of mature TRH and non-TRH peptides synthesized by transfected mammalian cells. *J Biol Chem.* 1989; 264(36):21529-35.

Shambaugh GE 3rd, Kubek M and Wilber JF. Characterization of rat placental TRH-like material and the ontogeny of placental and fetal brain TRH. *Placenta.* 1983; 4 (4):329-37.

Shioda S and Nakai Y. Medullary synaptic inputs to thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing neurons in the hypothalamus: an ultrastructural study combining WGA-HRP anterograde tracing with TRH immunocytochemistry. *Brain Res.* 1993; 625(1):9-15.

Spindel ER, Wurtman RJ and Bird ED. Increased TRH content of the basal ganglia in Huntington's disease. *N Engl J Med.* 1980; 303(21):1235-6.

Storm H, van hardeveld C and Kassenaar AAH. Thyroid hormone-catecholamine interrelationships during exposure to cold. *Acta Endocrinol* 1981; 97: 91-97.

Swanson LW and Kuypers HG. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol*. 1980 (a); 194(3):555-70.

Swanson LW, Mogenson GJ, Simerly RB and Wu M. Anatomical and electrophysiological evidence for a projection from the medial preoptic area to the 'mesencephalic and subthalamic locomotor regions' in the rat. *Brain Res*. 1987; 405(1):108-22.

Swanson LW and Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci*. 1983; 6: 269-324.

Swanson LW and Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*. 1980 (b); 31(6):410-7.

Swanson LW, Sawchenko PE, Wiegand SJ and Price JL. Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res*. 1980 (c); 198(1):190-5.

Tache Y, Stephens RL Jr, Ishikawa T. Central nervous system action of TRH to influence gastrointestinal function and ulceration. *Ann N Y Acad Sci*. 1989; 553:269-85.

Takeuchi Y, Miyanomae Y, Komatsu H, Oomizono Y, Nishimura A, Okano S, Nishiki T and Sawada T. Efficacy of thyrotropin-releasing hormone in the treatment of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol*. 1994; 9(3):287-9.

Tapia-Arancibia L, Arancibia S and Astier H. Evidence for alpha 1-adrenergic stimulatory control of in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat median eminence: in vivo corroboration. *Endocrinology* 1985;116(6):2314-9.

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT and Deeds J. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. 1995; 83(7):1263-71.

Theodosis DT and Poulain DA. Neuronal-glial and synaptic plasticity in the adult rat paraventricular nucleus. *Brain Res*. 1989; 484(1-2):361-6.

Toni R, Jackson IM and Lechan RM. Neuropeptide-Y-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1990 (a); 126(5):2444-53.

Toni R, Jackson IM and Lechan RM. Thyrotropin-releasing-hormone-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing-hormone-tuberoinfundibular neurons in rat hypothalamus:

anatomical basis to suggest ultrashort feedback regulation. *Neuroendocrinology* 1990 (b); 52(5):422-8.

Toufexis DJ, Thirvikraman KV, Plotsky PM, Morilak DA, Huang N and Walker CD. Reduced noradrenergic tone to the hypothalamic paraventricular nucleus contributes to the stress hyporesponsiveness of lactation. *J. Neuroendocrinol.* 1998; 10(6): 417-427.

Toufexis DJ and Walker CD. Noradrenergic facilitation of the adrenocorticotropin response to stress is absent during lactation in the rat. *Brain Res.* 1996; 737: 71-77.

Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Mendez M, Covarrubias L and Charli JL. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology.* 1991; 54(5):493-8.

Uribe RM, Redondo JL, Charli JL and Joseph-Bravo P. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1993; 58(1):140-5.

van den Pol AN. The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. *J Comp Neurol.* 1982; 206(4):317-45.

van Haasteren GA, Linkels E, Klootwijk W, van Toor H, Rondeel JM, Themmen AP, de Jong FH, Valentijn K, Vaudry H, Bauer K, et al. Starvation-induced changes in the hypothalamic content of prothyrotrophin-releasing hormone (proTRH) mRNA and the hypothalamic release of proTRH-derived peptides: role of the adrenal gland. *J Endocrinol.* 1995; 145(1):143-53.

van Haasteren GA, van Toor H, Klootwijk W, Handler B, Linkels E, van der Schoot P, van Ophemert J, de Jong FH, Visser TJ and de Greef WJ. Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotrophin secretion during lactation. *J Endocrinol.* 1996; 148(2):325-36.

Vernon RG and Flint DJ. Control of fatty acid synthesis in lactation. *Proc Nutr Soc.* 1983; 42(2):315-31.

Voogt JL and Carr LA. Plasma prolactin levels and hypothalamic catecholamine synthesis during suckling. *Neuroendocrinology* 1974;16(2):108-13.

Walker CD. Modifications neuroendocriniennes reliées à l'activité de l'axe corticotrope au cours de la lactation chez le rat. *Ann d'endocrinologie (Paris)* 1995; 56: 169-172.

Walker CD, Lightman SL, Steele MK and Dallman MF. Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 1992; 130: 115-125.

Wang HJ, Hoffman GE and Smith MS. Suppressed tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic system during lactation. *Endocrinology.* 1993; 133(4):1657-63.

Widdowson EM. Changes in the body and its organs during lactation: nutritional implications. *Ciba Found Symp.* 1976; (45):103-18.

Wilber JF and Xu AH. The thyrotropin-releasing hormone gene 1998: cloning, characterization, and transcriptional regulation in the central nervous system, heart, and testis. *Thyroid.* 1998; 8(10):897-901.

Windle RJ, Brady MM, Kunanandam T, Da costa APC, Wilson BC, Harbuz M, Lightman SL, and Ingram CD. Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to $\alpha 1$ -agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 1997; 138: 3741-3748.

Wintrip N, Nance DM and Wilkinson M. The effect of lactation on induced fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Research* 1997; 754: 113-120.

Woodside B, Abizaid A and Walker C. Changes in leptin levels during lactation: implications for lactational hyperphagia and anovulation. *Horm Behav.* 2000; 37(4):353-65.

Wu P, Lechan RM and Jackson IM. Identification and characterization of thyrotropin-releasing hormone precursor peptides in rat brain. *Endocrinology.* 1987; 121(1):108-15.

Yang H, Yuan P, Wu V and Tache Y. Feedback regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression by thyroid hormone in the caudal raphe nuclei in rats. *Endocrinology* 1999; 140(1):43-9.

Young WS 3rd. Corticotropin-releasing factor mRNA in the hypothalamus is affected differently by drinking saline and by dehydration. *FEBS Lett.* 1986; 208(1):158-62.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L and Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994; 372(6505):425-32.

Zoeller RT, Simony A, Butnariu O, Fletcher DL, Rudeen PK, McCrone S and Petersen SL. Effects of acute ethanol administration and cold exposure on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Stockton Press.* 1995; p39-47.

Zoeller RT, Kabeer N and Albers HE. Cold exposure elevates cellular levels of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus despite elevated levels of thyroid hormones. *Endocrinology.* 1990; 127(6):2955-62.

Zoeller RT, Wolff RS and Koller KJ. Thyroid hormone regulation of messenger ribonucleic acid encoding thyrotropin (TSH)-releasing hormone is independent of the pituitary gland and TSH. *Mol Endocrinol.* 1988; 2(3):248-52.

Differential Responses of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Neurons to Cold Exposure or Suckling Indicate Functional Heterogeneity of the TRH System in the Paraventricular Nucleus of the Rat Hypothalamus

Edith Sánchez^a Rosa María Uribe^a Gabriel Corkidi^a R. Thomas Zoeller^b
Miguel Cisneros^a Magali Zacarias^a Claudia Morales-Chapa^a
Jean-Louis Charli^a Patricia Joseph-Bravo^a

^aDepartamento Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca/Mor., México and ^bMorrill Science Center, University of Massachusetts, Amherst, Mass., USA

Key Words

Thyrotropin-releasing hormone · TRH mRNA ·
Cold stress · Suckling · Paraventricular nucleus ·
In situ hybridization · *c-fos*

Abstract

Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is released from the median eminence upon neural stimulation such as cold or suckling exposure. Concomitant with the cold- or suckling-induced release of TRH is a rapid and transient increase in the expression of proTRH mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus. We employed two strategies to determine whether TRH neurons responding to cold exposure are different from those responding to suckling. First, we attempted to identify a marker of cellular activation in TRH neurons of the PVN. Cold induced *c-fos* expression in about 25% of TRH neurons of the PVN, but no induction was observed by suckling. Moreover, we explored the expression of a variety of immediate early genes including NGFI-A, *fra-1* and *c-jun*, or CREB phosphorylation but found none to be induced by suckling. The number of cells expressing

high levels of proTRH mRNA was counted and compared to total expressing cells. An increased number of cells expressing high levels of proTRH mRNA was observed when both stimuli were applied to the same animal, suggesting that different cells respond separately to each stimulus. We therefore analyzed the distribution of responsive TRH neurons as defined by the cellular level of proTRH mRNA. The proTRH mRNA signal was analyzed within three rostrocaudal zones of the PVN and within six mediolateral columns. Results showed that in response to cold, all areas of the PVN of the lactating rat present increased proTRH mRNA levels, including the anterior zone where few hypophysiotropic TRHergic cells are believed to reside. The distribution of the proTRH mRNA expressing cells in response to cold was quite comparable in female and in male rats. In contrast, the response after suckling was confined to the middle and caudal zones. Our results provide evidence of a functional specialization of TRH cells in the PVN.

Copyright © 2001 S. Karger AG, Basel

Introduction

The hypophysiotropic role of thyrotropin-releasing hormone (TRH) is confined to the *parvocellular* neurons of the hypothalamic paraventricular nuclei (PVN) that project to the median eminence [see references in 1]. TRH secreted from the median eminence controls the synthesis and release of thyrotropin (TSH) [2, 3] and of prolactin [2, 4]. In response to cold exposure, TRH is released [5] causing elevation of serum TSH and thyroid hormones within minutes [6]. In response to suckling, TRH is released contributing to a surge in prolactin release [7, 8]. Cold or suckling stimuli induce a rapid and transient increase in proTRH mRNA levels in the PVN [9–12]. A peak is observed 30 or 60 min after initiation of suckling or cold exposure with values returning to normal after 60 or 120 min, respectively [10, 11]. It is generally believed that the cold- or suckling-induced activation of TRH neurons is mediated by transsynaptic mechanisms. This concept is based in part on the observation that activation of second messenger regulated protein kinases (PKA or PKC) augments proTRH mRNA levels in primary cultures of fetal hypothalamic cells [13, 14].

Several lines of evidence have led to the hypothesis that cold exposure activates the TRH system of the PVN via adrenergic afferents, and suckling, via serotonergic afferents, both from the brainstem [15, 16]. However, recent studies have brought this concept into question [17, 18]. Thus, although it is known that neurons from the brainstem project to and contact TRH neurons in the PVN [19, 20], and that pharmacological modification of catecholaminergic neurotransmission at the level of the median eminence can alter cold-induced activation of TRH neurons [21, 22], these pathways remain poorly understood.

Understanding the mechanism(s) whereby cold exposure and suckling independently activate TRH neurons and regulate TRH synthesis requires an understanding of the functional organization of hypophysiotropic TRH neurons. Specifically, do all hypophysiotropic TRH neurons respond to both cold exposure and to suckling? If not, are the hypophysiotropic TRH neurons that respond to suckling spatially separate from those that respond to cold exposure? To answer these questions, we have analyzed the distribution of the TRHergic neurons within the PVN that respond to cold exposure or/and suckling stimulus in the lactating rat, and searched for immediate early genes (IEGs) that mediate the response to suckling stimulus. Because all the studies on cold exposure have been performed in male rats, we compared the distribution of the

response to cold exposure in lactating dams to that of male, or virgin female rats. Our results provide the first evidence for a differential distribution of TRHergic neurons mediating the responses to cold exposure and suckling stimulus, supporting the concept that functional subsets of TRHergic neurons are differentially distributed within the PVN.

Material and Methods

All animal care and procedures used followed the 'Guidelines for the use of animals in neuroscience research' of the Society for Neuroscience (USA) and were approved by the Institute's ethics commission.

Wistar rats from the Institute's colony maintained in a 12-hour light/dark cycle (lights on at 7 a.m.) were fed Purina chow (PMI 5001) and water ad libitum. Animals were sacrificed by decapitation with a guillotine, trunk blood collected and serum aliquots were kept at -20°C . Brains were excised and kept at -70°C .

Experimental Design

Paradigm a. Male (350 ± 30 g; mean \pm SEM) or virgin female (250 ± 4 g) rats were exposed for 1 h at 4°C (10 a.m.). The animals that served as control were moved from the animal quarters to a room at $23\text{--}25^{\circ}\text{C}$ (room temperature, RT). Sacrifice was around 11 a.m.

Paradigm b. Primiparous female rats were mated, handled daily and kept in individual cages as described [10, 23]. After delivery, the litter was adjusted to 8 pups. At 12–14 days of lactation, 15 dams were separated from their pups at 7 a.m., for 8 h (–P). Three groups were formed: (a) 5 dams were exposed to 4°C for 1 h; (b) 5 dams were reunited with their pups which suckled for 30 min; (c) 5 dams remained in an adjacent room at RT (controls). Ten other dams remained with their pups (CS); 5 stayed at RT and 5 were exposed, together with their pups, for 1 h at 4°C . Sacrifice was around 4 p.m.

Paradigm c. Lactating rats separated from their pups for 8 h had their pups returned to suckle for 30 min at RT and the cages with mother and pups were transferred to the cold room for another 30 min (30/30). In another group of dams their pups were allowed to suckle for 10 min, were then exposed 60 min to cold (10/60). Controls (–P) stayed at RT in a separate room. The three groups were sacrificed around 4 p.m.

Hormone Quantification. Aliquots of serum from each animal were used to measure corticosterone (ICN diagnostic kit), TSH or prolactin (using reagents kindly supplied by NIDDK). Intra- and interassay variation coefficients were $<10\%$. In each experimental paradigm those rats that did not show TSH increase after cold stimulation or prolactin increase, after suckling, were discarded.

In situ hybridization (ISH). The frozen brain was mounted on a cryostat and $12\text{-}\mu\text{m}$ coronal sections cut and thaw-mounted on charged slides (Fisher Scientific, 12-550-15). Sections were stored at -70°C . The beginning of the PVN was recognized by the position of the fornix (P1600 [24]), slice 1 was identified by microscope observation of hematoxylin and eosin-stained section where the first 'patch' of magnocellular neurons appeared as described by Swanson and Kuypers [25]. Sections were processed for ISH as described [26]. Briefly, sections were fixed at RT in 4% paraformaldehyde in phos-

phate-saline buffer (PBS) for 10 min and rinsed twice with PBS followed by 10 min in 0.1 M triethanolamine/4 × SSC (300 mM NaCl/30 mM sodium citrate) 0.25% acetic anhydride and 2 min in 2 × SSC. They were dehydrated with ascending concentrations of ethanol (75, 80, 95 and 100%), treated for 5 min with chloroform, rinsed with 100%, then 95% ethanol, and air-dried.

For single ISH of proTRH mRNA, a 50mer oligonucleotide probe (317–367 bp from pro-TRH cDNA) [27], synthesized in the Institute's facilities, was labeled with terminal deoxynucleotidyl transferase (Boehringer-Mannheim) and [³⁵S]thiophosphate dATP (New England Nuclear). One picomole of labeled oligonucleotide (8×10^8 cpm/ μ g) was diluted in 1 ml hybridization buffer (4 × SSC, 50% formamide, 10% dextran sulfate, 100 mM sodium phosphate pH 7.4, 1% sarcosyl, 1 × Denhardt's solution (0.02% BSA, Ficoll and polyvinylpyrrolidone), 250 μ g/ml single-stranded salmon sperm DNA denatured 15 min at 65°C, 250 μ g/ml yeast transfer RNA, 100 mM DTT and 250 μ g/ml poly A). Forty-five microliters of this solution was applied to each section and covered with Parafilm; they were incubated overnight at 42°C in humidified chambers. Sections were then rinsed with 1 × SSC/15 min, twice with 1 × SSC-50% formamide at 45°C/30min and 4 times with 0.1 × SSC-0.02% SDS at 45°C/30 min followed by 2 min in 75, 80 and 95% ethanol and air-dried. Slides were coated with LM-1 autoradiographic emulsion (Amersham RPN 40), air-dried, and exposed for 10 days (male or virgin female tissues), or 14 days (lactating dams), at 4°C. Silver grains were developed for 3 min in a Kodak D19 developer, fixed (Kodak GBX), and counterstained with hematoxylin and eosin (Sigma).

The probes for analysis of IEG mRNAs (complementary or sense-strand) were generated in vitro from cDNAs, kindly provided by Drs. J. Milbrandt (St. Louis, Mo., USA; NGFI-A [28]), M. Muramatsu (Japan; *c-jun* [29]), and T. Curran (Nashville, Tenn.; *fra-1* [30]). The transcription reaction was performed in a final volume of 10 μ l. RNA was synthesized in the presence of 1 μ g DNA template (linearized plasmid), 500 μ M each of GTP, ATP and CTP, and 12 μ M UTP (α^{32} P-UTP at a molar ratio of 1:1). The cDNAs were linearized with appropriate restriction enzymes under standard conditions and transcribed in the presence of RNA polymerase. After transcription, the DNA template was removed by deoxyribonuclease digestion, and the probe was purified by phenol:chloroform extraction followed by two ethanol precipitations. The size and integrity of the labeled probes were verified by electrophoresis on a 6% sequencing gel. The hybridization conditions were essentially as described above with the following modifications. First, the hybridization buffer contained 2 × SSC and lacked sheared single-stranded DNA. The hybridization was incubated at 52°C using glass coverslips, and an RNase digestion was performed for 30 min at 37°C in a buffer containing 0.5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl and 1 mM EDTA, pH 7.4.

Double in situ Hybridization (DISH). The rat proTRH cDNA, kindly provided by Dr. Goodman [27], was used to prepare the cRNA probe labeled with digoxigenin-11 UTP. cRNA was prepared essentially as described above with the following modifications: 1 μ g of DNA template, 1 mM of GTP, ATP and CTP, 1 mM of digoxigenin (Dig)-UTP and 0.2 mM UTP, no phenol-chloroform extraction, precipitation with 15 mM DTT, 0.3 M sodium acetate pH 7.4 and 3 volumes of ethanol. Integrity of the probe was verified by transfer from 6% native acrylamide gel to a nylon membrane, visualized with anti-Dig alkaline phosphatase and reagents for color development (Boehringer).

The rat *c-fos* cDNA was prepared by cloning a 531-bp region spanning the sequence 134–665 as defined by Curran et al. [31]. Cloning was accomplished by RT-PCR and the authenticity of the fragment was confirmed by sequence analysis. This cDNA was used to prepare a [³⁵S-UTP]-labeled cRNA probe. In vitro transcription of the antisense was performed as described above. Total *c-fos* expression was quantified in film autoradiographs.

ProTRH mRNA-positive cells were detected using anti-Dig peroxidase and dark brown color developed with diaminobenzidine-H₂O₂ as described [26]. Photographic emulsion was then applied for autoradiographic visualization of *c-fos* mRNA. Coexpression was measured by quantifying the number of brown cells with >8 silver grains.

Detection of CREB and Phosphorylated CREB (CREB-P). A modified version of reported protocols [32, 33] was followed. Briefly, 12- μ m frozen sections were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde-PBS-1 mM Na vanadate-25 mM NaF followed by 2 washes with PBS and incubated for 15 min with 0.5% H₂O₂ in PBS. After 3 washes with PBS, sections were incubated for 1 h in 0.5% Triton X-100 in PBS, then 90 min at RT in 2% normal goat serum. Tissues were incubated at 4°C for 2 days with CREB or CREB-P antibodies (New England Biolabs No. 9190) used at 1:500 or 1:100 final dilution in 1% normal goat serum-PBS-1 mM sodium vanadate-25 mM NaF. After 2 × 10 min washes with PBS, slides were incubated with biotinylated anti-goat IgG-rabbit antibody (1:200) solution for 2 h at RT, rinsed with PBS, and further incubated for 1 h using avidin-biotin (ABC, Vector Labs). Sections were then rinsed 3 × (10 min each) with PBS, once with Tris 0.05 M pH 7.8, and color developed with 0.025% diaminobenzidine, 0.04% nickel ammonium sulfate, 0.0036% H₂O₂ for 7 min. Reaction was stopped with Tris 0.05 M pH 7.8; tissues were dehydrated in ethanol (75, 85, 95 and 100%), xylol-treated and mounted with mounting medium (Baxter M7630-2).

The technique was verified using male rats exposed 5 min to ether and sacrificed after 15 min. Higher levels of CREB were observed in magnocellular cells of PVN than in parvocellular cells of control animals. Upon ether exposure, CREB-P, undetected in the parvocellular PVN of controls, was now easily observed (not shown), as previously described [33].

Image Analysis. TRH autoradiographic signal was quantified in the PVN using a video camera (COHU 4815) mounted over a Zeiss microscope and a Biocom imaging station (Histoscan, Biocom, France).

TRH Cell Count. PVN contour was drawn manually with the mouse over the 10 × light microscope image (fig. 1A–C). A program (macro-command) was designed to allow interaction with the motorized stage (Märzhauser); a grid of identical squares (150 μ m²) was drawn automatically over the PVN area. The motorized stage moved to each consecutive square (at 40 ×). Each neuron was classified visually according to a defined category ($a = 8$ grains or over; $b \geq 30$) and given a different mark for each category. The marks in each square were registered by the computer and the number of cells for each category counted. Cells of b category are referred as high level of proTRH mRNA expression (HL).

Analysis of ProTRH mRNA Expression

Method A: After delineating in bright field the PVN contour, the illumination was changed to dark field; the integrated signal of optical density (OD; light reflected by silver grains), calibrated in silver grains, was measured. An equivalent area outside the PVN was quantified and subtracted from the signal of the PVN. Results of total

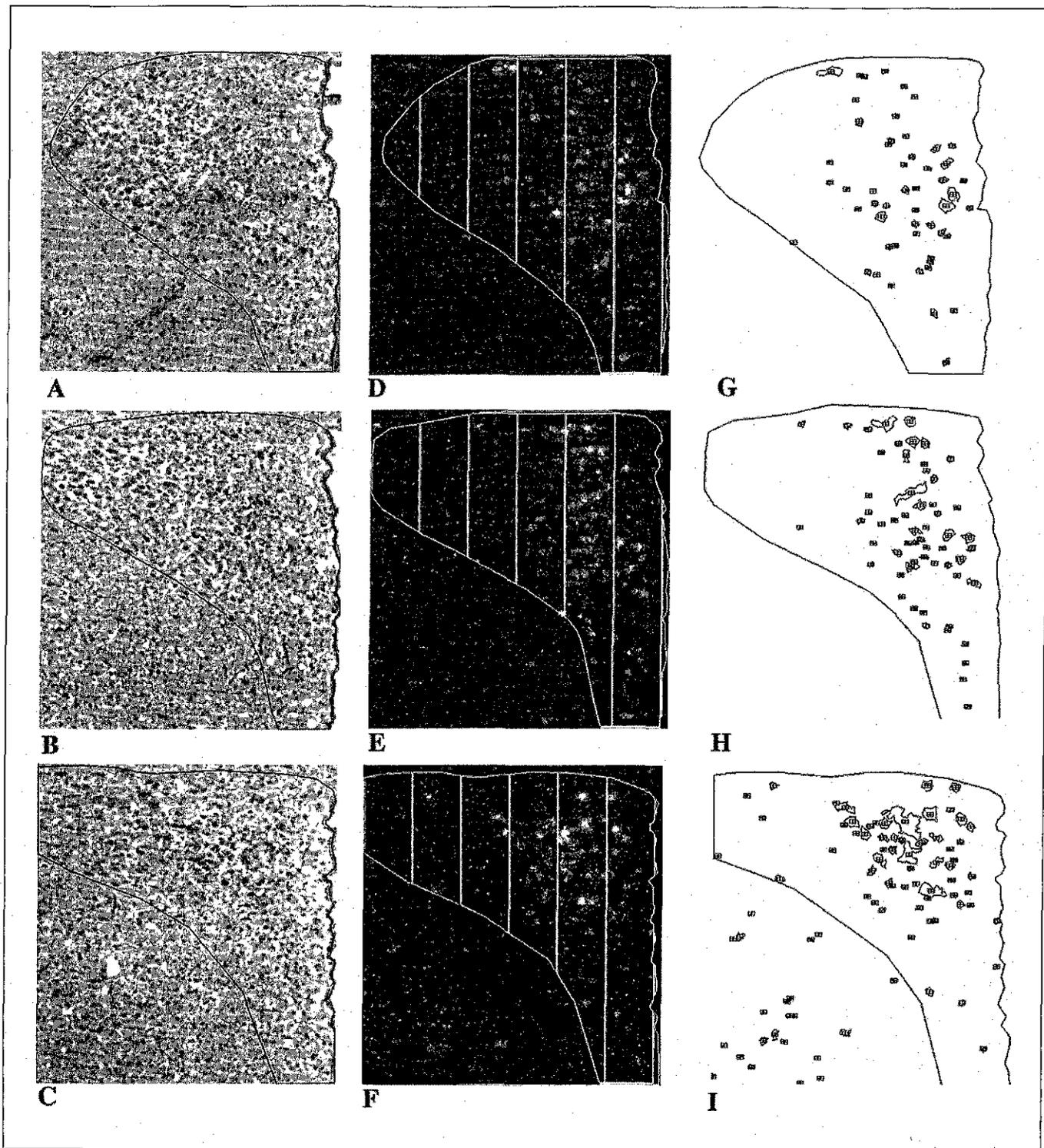


Fig. 1. Representative images of proTRH mRNA signal in the three zones of PVN. Direct computer prints captured by BioCom software (10 \times) of: bright field image of anterior (**A**), middle (**B**) or caudal (**C**) sections, stained with hematoxylin, of the lactating rat PVN with contours manually drawn. Same sections on dark-field illumination (**D-F**) with a 6-lane grid as specified in Methods (method B). Pictures of the same sections after delineating the contours of proTRH mRNA signal (**G-I**) as specified for method C.

silver grains (not divided by area) for left or right PVN were registered in a table. Sections (2–5) corresponding either to anterior, middle or caudal zones were pooled for analysis.

Method B: Analysis of signal distribution within the PVN. A macro-command was developed to place a 6-lane grid over the PVN, taking as reference the third ventricle, and drawing the PVN contour (10× on bright field). In dark field, each left or right PVN was divided in six equivalent lanes aligned parallel to the third ventricle (fig. 1D–F). The lane width was fixed once for all measurements, taking one sixth of the length between the third ventricle and the border of the magnocellular zone of a section corresponding to the middle PVN. Lane 1 was closest to the ventricle, lane 6 bordered the magnocellular zone. OD was quantified in each of the 6 lanes for the left and right PVN. The signal of an equivalent area outside the PVN was measured ('noise') and subtracted from each 'lane'. Total signal – 'noise' was registered; it was not divided by area in order to visualize the distribution of proTRH mRNA signal along the total PVN area. Results were processed with programs for graphic (Microsoft Excel) and statistical analysis. Results are expressed as the means of equivalent sections from different animals.

Method C: After delineating PVN contours in 10× bright field, the illumination was changed to dark field. In order to map proTRH mRNA signal distribution, a first automatic contour was achieved with a threshold covering all bright zones; this was taken as the total distribution of proTRH mRNA signal. In a second step, the segmentation threshold was readjusted to detect and map only those cells having the highest mRNA levels (from scale 0–250 it was set at 90–250). Both maps (total or high level signal) were printed to evaluate the distribution of the signal. Each figure of left or right PVN was stored with the marked contours (fig. 1G–I).

Statistical Analysis

Data from left or right PVN either of TRH cell counts, or number of TRH cells expressing *c-fos* or proTRH mRNA levels/zone (method A) were similar and therefore pooled; 2–5 sections/zone were analyzed for each animal and the mean value was considered as one determination. The number of rats used (n) is stated in the legends. Comparison of groups was performed with one-way ANOVA ($p < 0.05$) followed by multiple comparison (Fisher's test). Student's *t* test was also used. Significance was considered with $p < 0.05$. Results are expressed as the mean \pm SEM and correspond to a representative experiment for each paradigm. Two different experiments (with different lots of rats) were performed for each paradigm, and two or more ISH for each, obtaining similar results; however, since variations could be observed in the total signal between different experiments, in order to express them in OD values, only one representative ISH is shown. Results from method B were analyzed for statistical significance by ANOVA, between each lane of control and stimulated animals; to maintain clarity in the figure, they are not shown but only significant differences are mentioned. At least two different experiments were performed and each analyzed twice by independent ISH trials on different sections, giving similar results.

Results

The distribution of proTRH mRNA signal varies throughout the PVN in a rostrocaudal gradient [34]. Therefore, for the purposes of analysis, the PVN was

divided into three zones. First, the *anterior* zone corresponded to the area beginning with the rostral tip of the PVN and extending caudally to the first appearance of magnocellular neurons [25] (P 1,600–1,800 μm [24]). Second, the *middle* zone extended from the beginning of the posterior magnocellular zone; this region comprises more slices than the other two and extends through the greatest volume of the PVN (P 1,800–2,100 μm [24]). Finally, the *caudal* zone appears when the fornix is in the inferior lateral part of the PVN and proTRH mRNA signal forms a cumulus that is more separated from the third ventricle and towards the dorsal area of the PVN (fig. 1, 2) (P 2,100–2,300 μm [24]). The ventral and dorsal medial part (*mp*) and dorsal parvocellular division described by Swanson et al. [25] are included in our *middle* and *caudal* zones. The references to the atlas described above correspond to male PVN. The distribution of proTRH mRNA was similar in male or female animals, but female brains showed a more extended PVN (approximately 100 μm in the rostrocaudal direction), especially in the middle zone (fig. 1).

Response of Male or Virgin Female Rats to Cold

Male rats exposed to cold for 1 h showed an increase in serum TSH and corticosterone levels (table 1). No variation was observed in the total number of proTRH mRNA-positive cells throughout the PVN of control or stimulated animals; there was a 3-fold increase in the number of cells expressing >30 grains/cell (HL) in the three zones of the animals exposed to cold.

Analysis of the distribution of proTRH mRNA expressing neurons was performed by comparing methods A and B in the same lot of animals and in the same hybridization assay (fig. 3). An increase to $*272 \pm 44\%$ was detected in the anterior zone, $*234 \pm 36\%$ in middle and $*255 \pm 52\%$ in caudal zones (controls = 100%; $*p < 0.01$) (fig. 3A). The highest increase in proTRH mRNA levels was observed in lanes 2 and 3, probably corresponding to the periventricular area (fig. 3B, C); in the anterior PVN, response was also observed in lanes 4 and 5. Virgin female rats gave similar results (not shown) but with higher deviation perhaps due to estrous cycle variations [23].

Colocalization of *c-fos* with proTRH mRNA was observed in $7 \pm 3\%$ of TRHergic cells in the total PVN of males and $11 \pm 2\%$ in virgin females. These values increased to 21 ± 3 and $28 \pm 1\%$ after cold exposure of male or virgin female animals, respectively. This response was observed in the three zones of the PVN; the relative increase of total *c-fos* mRNA levels after cold exposure was higher in male than female animals (table 2). The

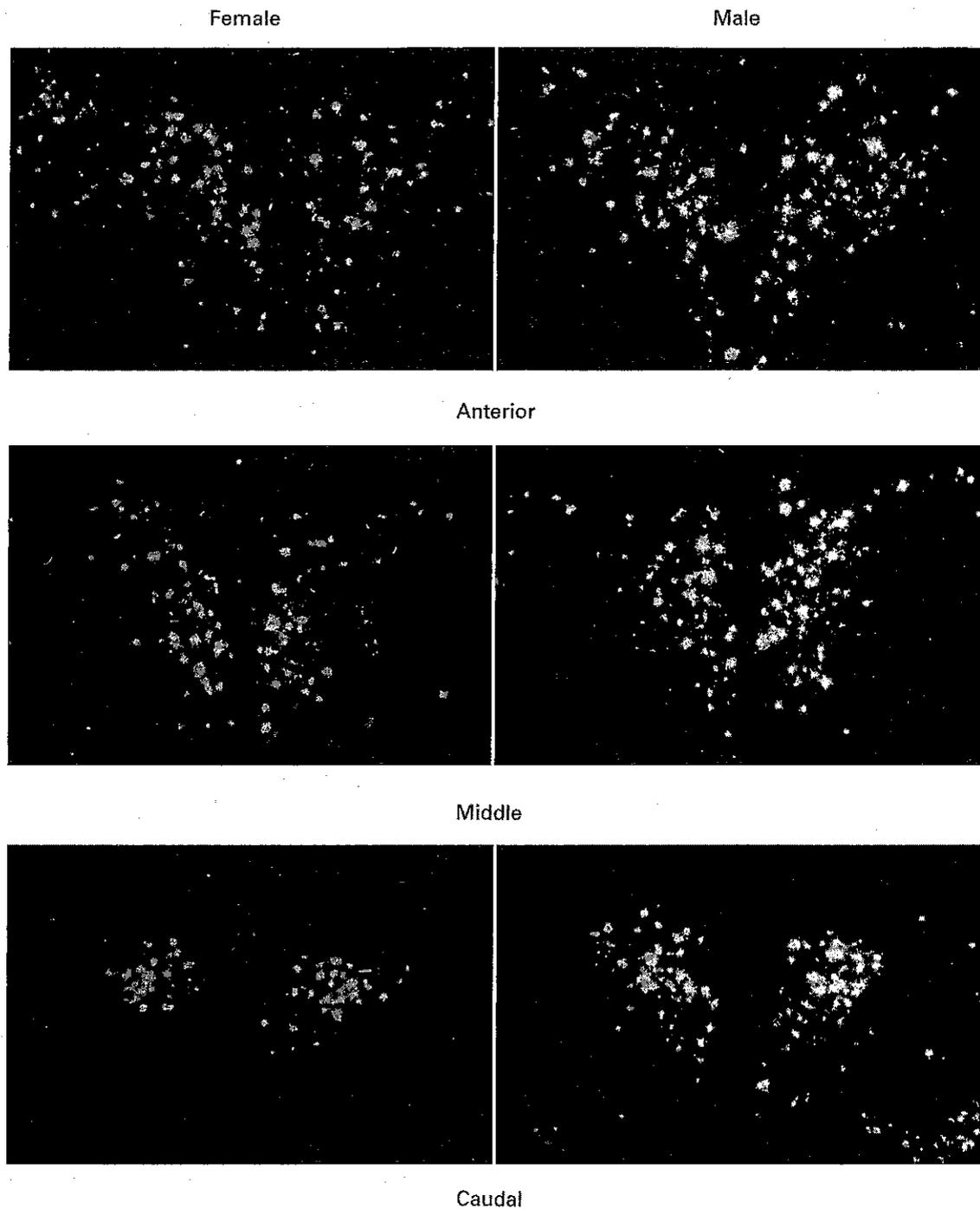


Fig. 2. Rostrocaudal distribution of proTRH mRNA hybridization signal in the PVN of male and virgin female rat. Dark-field illumination, 10× photomicrographs of representative coronal sections (12 μm) of anterior, middle or caudal zones, hybridized with a ³⁵S-dATP-labelled oligonucleotide probe; silver grains were developed after 10 days' exposure.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

104

Table 1. Serum hormone concentrations of control and stimulated rats

		FSH ng/ml	Corticosterone ng/ml	Prolactin ng/ml
Male	RT	3 ± 1	589 ± 66	-
	60 min 4°C	7 ± 1*	1,444 ± 215*	-
Female	RT	2 ± 1	416 ± 72	-
	60 min 4°C	5 ± 1	1,146 ± 279*	-
Lactating -P	RT	4 ± 1	50 ± 6	25 ± 5
	30 min suck	5 ± 0.2	314 ± 33*	110 ± 40*
	30 min 4°C	9 ± 1*	384 ± 114*	-
	60 min 4°C	6 ± 1	350 ± 20*	27 ± 4
Lactating CS	RT	4 ± 1	195 ± 57	>100
	60 min 4°C	5 ± 1	422 ± 17*	120 ± 43
Lactating -P	RT	4 ± 0.1	572 ± 93	95 ± 12
	30/30 suck/4°C	9 ± 1*	1,174 ± 271	522 ± 158*
	10/60 suck/4°C	11 ± 1*	846 ± 261	708 ± 168*

-P = Lactating dams separated from their pups for 8 h; CS = lactating dams maintained with their pups. Combined stimulation: -P dams had their pups returned to suckle for 30 or 10 min and then exposed to cold for 30 or 60 min, respectively. * $p < 0.05$ (Student's *t* test vs. controls; $n = 5$). Prolactin levels >100 = all samples were above saturation limit of RIA (1,000 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$). - = Not determined.

number of cells/section expressing proTRH mRNA (Dig-stained) did not vary with treatment (i.e. male RT: anterior = 77 ± 7 ; medial = 70 ± 3 ; caudal = 62 ± 4 ; 4°C: anterior = 70 ± 3 ; medial = 81 ± 10 ; caudal = 73 ± 4). Total *c-fos* expression was also increased in the cerebral cortex and in part of the thalamus of both animals (analyzed in the same sections, not shown; no other structures were searched).

Response of Lactating Female Rats to Cold

Serum corticosterone concentrations can vary depending on the time of pups removal. The response to cold in dams that kept their pups throughout the experiment (CS) was therefore compared to that of dams whose pups were separated 8 h before cold exposure (-P), in animals from the same lot. Serum TSH levels were higher at 30 min than 60 min after cold exposure in -P dams; no variation in TSH levels was observed in CS dams. Corticosterone levels increased 7-fold in -P compared to 2-fold in dams that had their pups all the time (CS) (table 1). Prolactin levels were low in -P dams and were unchanged by cold stress. Lactating dams exposed to cold together with their pups remained near their pups in an alert position moving sometimes around the cage; suckling by their pups was intermittent and was reflected in the high variation of prolactin levels in this group (table 1).

Dams kept with their pups (CS) had a higher basal expression of proTRH mRNA than those that had been separated (-P) (fig. 3E vs. fig. 3H and 3K). No increase in proTRH mRNA levels was observed in -P dams exposed only 30 min to cold (fig. 3G). Total number of TRH expressing cells was similar in control and stimulated animals whether or not they had their pups removed, while the number of HL cells increased in both groups after 60 min cold exposure (table 3). ProTRH mRNA levels increased in the three PVN zones of dams exposed to cold for 60 min (anterior = 181%; medial = 200%; caudal = 217%; controls = 100%) (fig. 3D, G); analysis by lanes showed the increase in signal to be confined closer to the periventricular part of middle and caudal zones (lanes 1-3), but spreading to lanes 4-5 in -P group (fig. 3F, I).

Lactating dams (-P) maintained at RT showed barely detectable *c-fos* expression in the PVN; however, total *c-fos* mRNA levels raised after 30 min of cold exposure remaining at these levels after 60 min in the three zones of the PVN (table 2). No TRHergic cells expressing *c-fos* were detected in control lactating dams in contrast to male or virgin females. After cold exposure, lactating dams showed >20% of TRHergic cells coexpressing *c-fos* mRNA (table 2). No variation was observed in the number of Dig-stained cells.

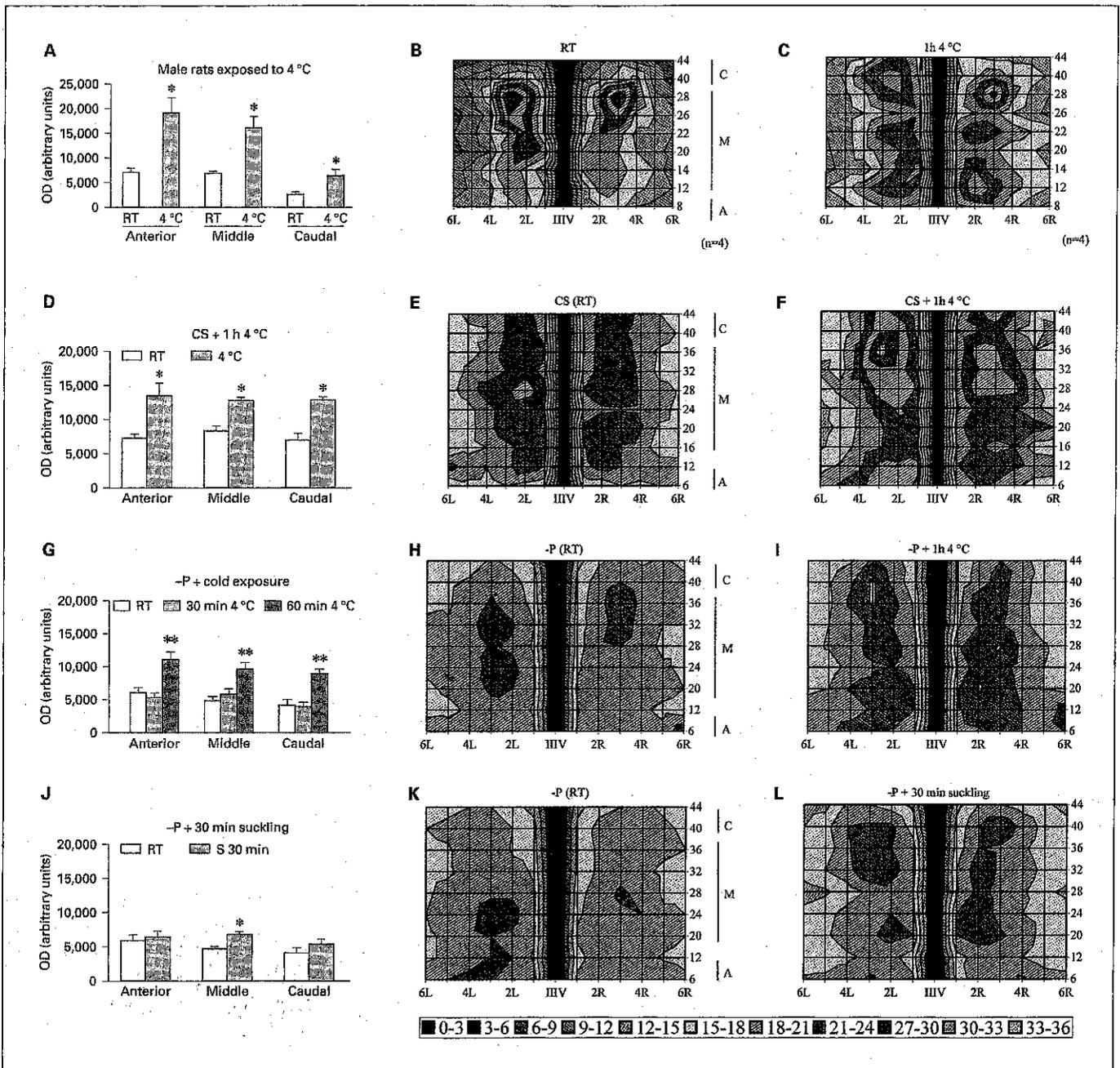
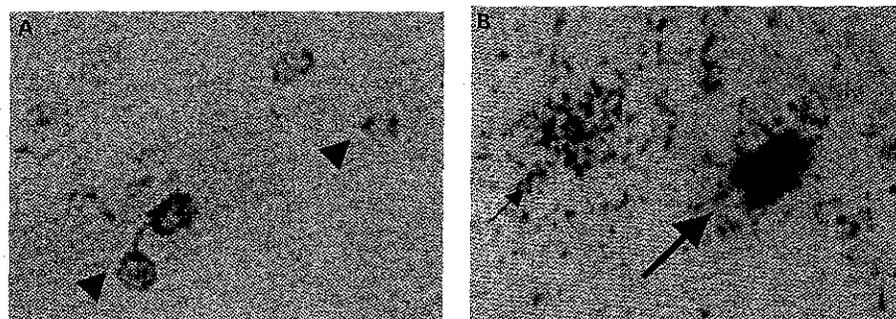


Fig. 3. Effect of 1 h cold exposure in male rats and response of lactating dams to cold or suckling exposure. Male rats were exposed for 1 h at 4 °C or at RT. **A** The mean \pm SEM of total PVN signal in anterior, middle or caudal sections ($n = 4$ rats; * $p < 0.01$ compared to RT). **B, C** Panoramic view representing data following method B taking the average of equivalent sections from different animals and processed as a 3D graph (Excel). X axis = the 6 lanes of left or right PVN; Y = rostrocaudal distribution and Z = OD values obtained (color changes every 30,000 = OD units). **D, G, J** The mean \pm SEM of total proTRH mRNA levels in PVN sections of anterior, middle and caudal zones of: lactating dams that kept their pups all the time (CS) and exposed 1 h to cold (**D**); lactating dams whose pups were separated 8 h before (-P) and exposed for 1 h to cold (**G**), or lactating dams whose pups were returned and allowed to suckle for 30 min (**J**). $n = 4$; * $p < 0.05$. **E, F, H, I, K, L** Diagrams of each of the above-mentioned groups analyzed by method B as described above.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Table 2. Analysis of *c-fos* expression in the PVN of cold-exposed animals



	<i>c-fos</i> mRNA levels			Percentage of cells coexpressing <i>c-fos</i> and proTRH mRNA		
	A	M	C	A	M	C
<i>Males</i>						
RT	100±2	100±2	100±3	1±0.1	7±3	9±3
60 min 4°C	*163±5	*154±6	*132±7	*19±3	18±3	*29±3
<i>Virgin females</i>						
RT	100±8	100±3	100±8	21±5	10±2	8±3
60 min 4°C	128±10	138±28	110±7	31±3	*25±2	*42±7
<i>Lactating females</i>						
RT	100±2	100±3	100±1	0	0	0
30 min 4°C	*125±2	*132±4	*123±8	*28±12	*39±1	*22±5
60 min 4°C	*124±6	*124±3	*125±5	*25±1	*27±2	*23±1

c-fos mRNA levels were quantified in film autoradiographs of PVN of control and stimulated animals. Data represent the mean of 6 slides from 5 animals (2–3 slides corresponding to anterior (A), middle (M) and caudal (P) zones of the PVN) as % of control values. Number of cells coexpressing *c-fos* and proTRH mRNA were counted manually; results are expressed as the % of total number of cells expressing proTRH mRNA. * $p \leq 0.01$ (Student's *t* test vs. controls; $n = 5$).

Insert depicts pictures of DISH: (A) arrowheads show representative proTRH mRNA signal (dark brown staining); (B) small arrow represents a *c-fos*-positive cell (silver grain clusters); large arrow indicates a proTRH mRNA/*c-fos* mRNA double-labeled cell. Orig. magn.: 10× (A), 40× (B).

TESIS CON
BALLA DE ORIGEN

Response of Lactating Female Rats to Suckling

Suckling response was measured in lactating rats previously separated from their pups for 8 h (–P) in the same lot as described above. Suckling induced a 4× increase in serum prolactin levels and an increase in corticosterone levels similar to that observed in –P cold-stimulated animals, while no variation in TSH release was observed, as previously reported [12] (table 1). Total number of TRH-ergic cells did not vary upon stimulation but HL cells increased in middle and caudal zones (table 3). An increase in proTRH mRNA levels was detected in the middle zone (145%) (fig. 3J); however, in another lot of animals, significance was also observed in the caudal zone (not shown). The increase in proTRH mRNA level oc-

curred mainly in the periventricular area (fig. 3K, L); signal distribution, and magnitude of the response differed from that in cold-exposed –P dams (compare fig. 3L with 3I), particularly in the anterior zone where no increase was observed after suckling.

DISH analysis of every fourth slide through the whole PVN of suckled dams showed no expression of *c-fos* mRNA. Considering the failure of *c-fos* induction by suckling in the PVN, we expanded the number of activity-induced genes that may provide a marker of TRH neuronal activation. We separately evaluated NGFIA, *fra-1*, and *c-jun* mRNA levels, but found that none were induced in the PVN by the suckling stimulus (data not shown). Moreover, only *c-jun* mRNA was expressed con-

Table 3. Total number of cells expressing TRH mRNA and number of cells expressing high levels of TRH mRNA in the PVN of lactating dams in response to cold exposure and/or suckling

Experimental paradigm	Anterior		Middle		Caudal	
	total	HL	total	HL	total	HL
<i>Dams with pups (CS)</i>						
Room temperature	92±7	15±4	100±6	18±4	76±9	16±3
60 min cold exposure	91±16	26±8	115±20	28±8	85±15	24±8
<i>Dams 8 h pups separation (-P)</i>						
Room temperature	103±6	15±5	110±9	12±3	81±7	12±1
60 min cold exposure	109±5	25±2*	113±8	22±5*	85±12	18±1*
30 min suckling	112±11	21±7	136±11	19±2*	106±1	15±1
<i>Combined stimuli (-P dams)</i>						
Room temperature	86±14	16±6	91±6	14±2	94±3	16±2
30 min suckling + 30 cold	106±7	28±6	108±2	42±4 ⁺	81±15	32±2*
10 min suckling + 60 cold	106±4	46±8 ⁺	106±4	42±2 ⁺	77±17	40±12 ⁺

Cells expressing >30 grains were counted on sections hybridized with a proTRH mRNA probe as described in Material and Methods. Each image was analyzed with a Biocom analysis system. 2–4 sections were analyzed/zone for each rat and the resulting average taken as one independent determination. Results are the mean ± SEM, n = 4; *p < 0.05, ⁺p < 0.01.

stitively, despite the lack of effect of suckling on the expression of this gene. We therefore analyzed CREB-P in 2 slides/rat contiguous to one where increased proTRH mRNA expression was observed. While signal was observed in cortex and hippocampus, none was evident in PVN (not shown).

Combined Cold and Suckling Stimuli

In an attempt to determine whether the same cells were responding to both stimuli, we measured the response of lactating dams (-P) to either 10 or 30 min of suckling followed by introducing the cage with pups into the cold room for 60 or 30 min, respectively. These experiments were performed the same day using the same lot of rats. Times were chosen due to our previous observation that the maximal increase in proTRH mRNA levels was observed after 30 min of suckling or 60 min of cold exposure [10].

TSH serum levels increased in both groups (30/30: 225%; 10/60: 275%) to a similar extent of what was observed in male (233%), virgin (250%) or -P lactating rats (225%) (controls: 100%). In the group of animals used for combined stimuli, controls had higher basal levels of serum corticosterone compared to previous lots; differences in basal corticosterone levels between different lots, assayed at different times of the year, have been observed in several experiments. The reasons for these variations are unknown, but it should not affect the interpretation of

data since comparisons were made only inside the same lot of animals. Levels of serum corticosterone were increased 2-fold in 30/30 animals, but no significant difference was observed in the 10/60 group compared to controls. In both groups, serum prolactin levels increased over 5-fold, with no difference between those whose pups were allowed to suckle for 10 or 30 min (table 1).

Despite the hormonal response being similar for both groups, proTRH mRNA expression was slightly higher in the 10/60 group (fig. 4). These animals probably received enough time of suckling and the highest stimulation by cold. A higher increase in the number of HL cells was observed in these two groups, in the three zones of the PVN, compared to lactating animals exposed only to cold or suckling (table 3). ProTRH mRNA signal quantification of pooled sections by PVN zone showed significant changes in anterior (159%), middle (214%) and caudal zones (166%) of 10/60 group, while in the 30/30 group a significant increase was only observed in the middle zone (191%) (controls = 100%) (fig. 4A).

Analysis of the distribution of proTRH mRNA expression showed the highest increase in the periventricular area being more pronounced in the 10/60 than in the 30/30 group. In contrast to animals receiving only cold or suckling stimulus, these animals showed additional increase in areas further apart from the third ventricle (lanes 4–6), specially in the anterior and middle zones (fig. 4B–D).

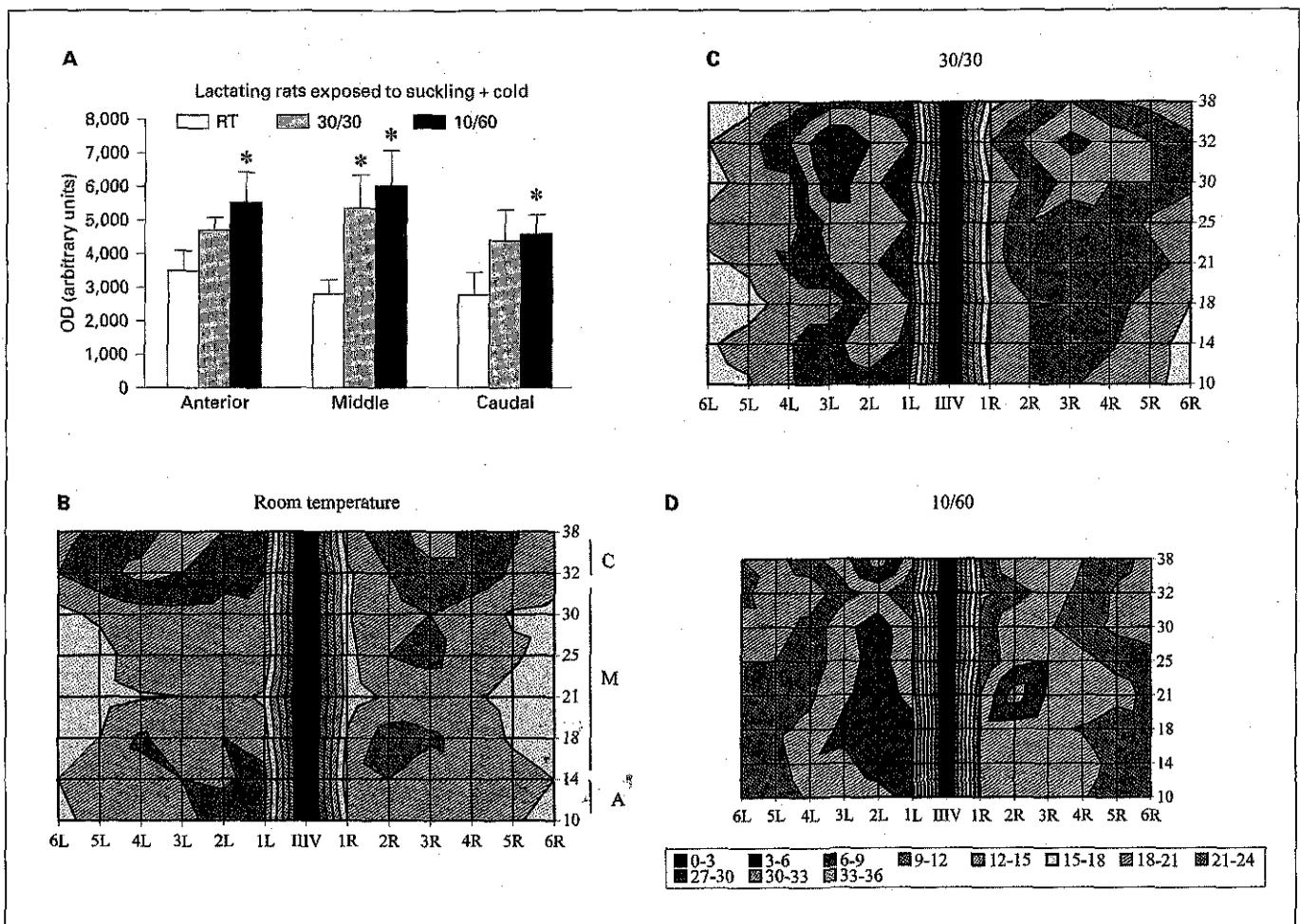


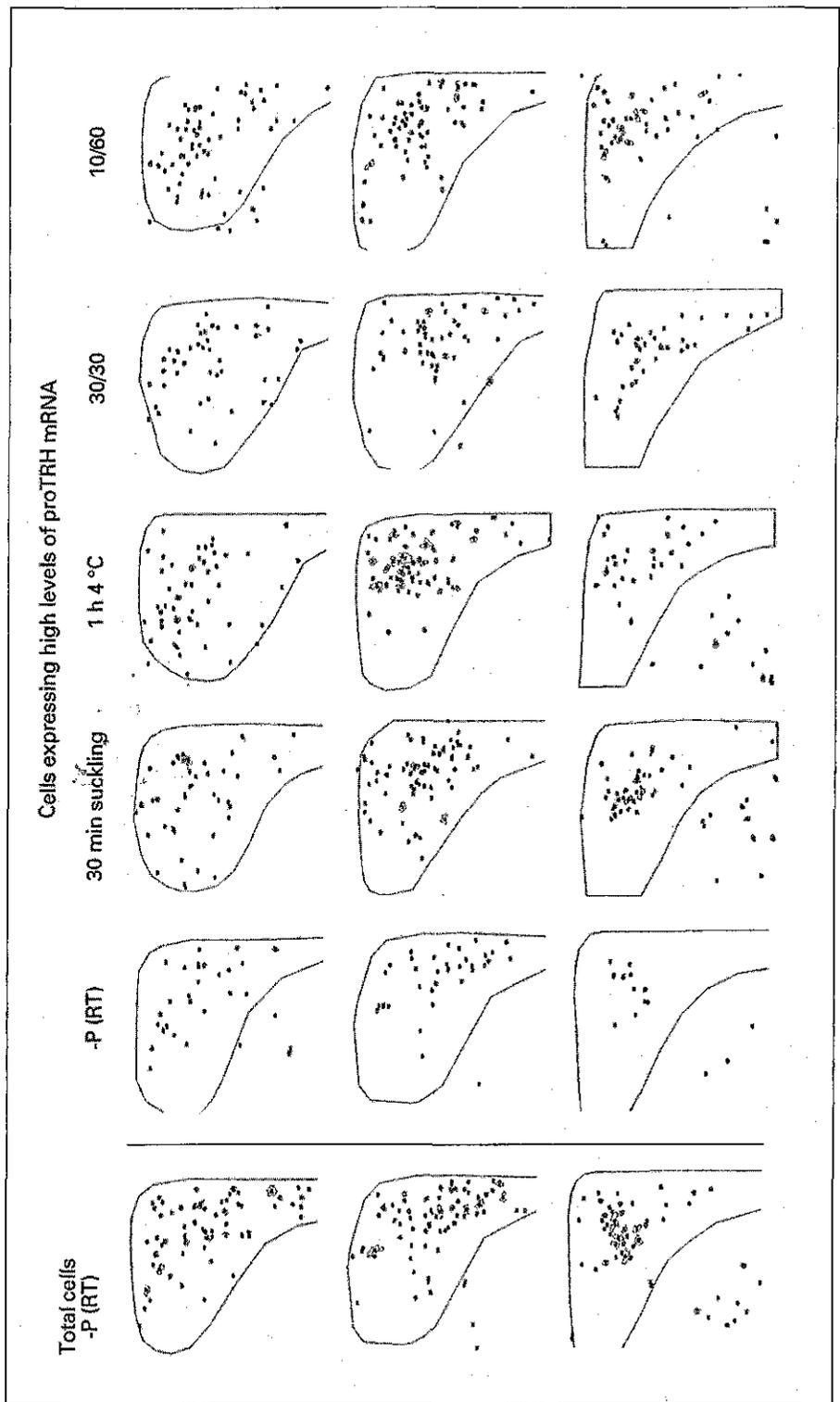
Fig. 4. Response of lactating dams to combined suckling and cold stimulus. Results are represented as stated in figure 3. Lactating dams were separated from their pups for 8 h; pups were returned and allowed to suckle for 30 min or 10 min. The cage was then introduced to the cold room where it remained for 30 or 60 min, respectively. **A** Analysis of total proTRH mRNA levels in pooled sections of anterior, middle and caudal PVN (mean \pm SEM; * $p < 0.01$). **B** Control animals = lactating dams left at RT. **C** Animals were exposed to 30 min suckling and 30 min at 4°C. **D** 10 min suckling, 60 min at 4°C. $n = 3$.

Distribution of Cells Expressing High Levels of TRH mRNA in Lactating Dams Exposed to Various Stimuli

In an attempt to visualize the distribution of the signal and compare it with Swanson's maps [25], we followed procedure C, printing the contour of those cells (or cumulus) that expressed high level of signal (above 90 on scale 0–250 as described in Methods). Representative prints of equivalent slides are shown in figure 5. The threshold established for this procedure was stringent (only $60 \pm 4\%$ of the cells previously detected without threshold were considered) to facilitate visualization of cells expressing high proTRH mRNA levels. It was however less stringent

than the manual count of cells expressing >30 grains. As can be observed, there is no clear-cut separation of cells responding to suckling stimulus compared to cold in the middle or caudal zones. Animals submitted to cold stimulation, however, showed an increased number of high signal cells in an area of the anterior PVN that does not correspond to the periventricular area. Animals that received 10 min of suckling and 60 min of cold stimulation (10/60) presented a similar distribution of HL cells than animals exposed only to cold for 60 min.

Fig. 5. Comparison of the distribution of cells expressing high levels of proTRH mRNA in lactating dams exposed to cold, suckling, or the combined stimuli. Figure depicts the computer prints of cells expressing high proTRH mRNA levels (method C). Left PVN of anterior (1st row), middle (2nd row) or caudal zone (3rd row). First column corresponds to the total signal in PVN of lactating dams (without pups for 8 h: -P); second column: same sections but pictures of cells expressing high levels (HL) of proTRH mRNA; third-sixth columns: representative pictures of HL cells corresponding to each experimental group.



TELIS CON
FALSA DE ORIGEN

Discussion

The goal of the present studies was to test the hypothesis that distinct subsets of TRH neurons in the hypothalamic PVN separately mediate the thyrotropic response to cold and suckling stimulus. We employed two strategies to test this hypothesis. We determined the regional distribution of TRH neurons responding either to cold exposure or to suckling. We found that TRH neurons residing in the rostral PVN responded solely to cold exposure, whereas TRH neurons in the middle and caudal zones responded both to cold exposure and to suckling. The response to cold in lactating dams was similar to that of males or virgin females. The total number of proTRH mRNA expressing cells was not modified in any of the experiments; the effects of treatment were observed on the number of cells expressing >30 grains/cell (HL). It must be considered that these numbers can be undervalued since it is difficult to distinguish single cells when the cells are clustered spatially as occurs in the middle zone. The combined treatment with cold exposure and suckling increased the number of HL cells to higher magnitude than those observed after cold or suckling-stimulus alone, suggesting that cold-responsive TRH neurons could be different from suckling-responsive TRH neurons. However, this could also be due to additive increases in the same cell in response to both stimuli (an overall increase in the steady-state levels of TRH mRNA), even though there was no apparent increase in the total number of proTRH mRNA-expressing cells. Furthermore, the relative increase in total proTRH mRNA/zone was not higher in the combined stimuli (10/60) compared to the one observed in cold stimulated -P dams. We therefore tried different alternatives that would allow the identification of responsive neurons to each stimulus.

One strategy was to identify a marker of neuronal activation particular to either cold- or suckling-responsive TRH neurons. We found that cold-exposure induced *c-fos* expression in approximately 25% of TRH neurons in the PVN. However, suckling did not induce *c-fos* expression in TRH neurons of the PVN, neither that of several additional IEGs (CREB-P, NGFIA, *fra-1*, *c-jun*). These data indicate that the cellular response of TRH neurons to cold exposure differs from that of TRH neurons to suckling. Because both responses were observed in lactating females with the same endocrine milieu, these data suggest that the neural pathway activating TRH neurons during cold exposure are separate from those activating TRH neurons during suckling.

Although male and virgin female rats exhibited similar induction of *c-fos* mRNA following cold exposure as observed in lactating dams, the levels of *c-fos* mRNA were barely detectable in the PVN of lactating dams, despite clear expression in cerebral cortex, hippocampus and PVN of the thalamus. Previous studies indicate that *c-fos* expression is reduced during lactation. For example, Fos-like immunoreactivity in the PVN diminishes after parturition and remains low through the 3 weeks of lactation [35]. Fos-positive cells are diminished in the supraoptic nucleus of lactating compared to parturient dams and no increase is observed after suckling stimulation whether in overall cells or in oxytocin-positive ones [36]. Moreover, hemorrhage or water deprivation cause an increase in the number of Fos-oxytocin and Fos-vasopressin expressing cells, but the number of Fos-positive cells is reduced in lactating dams [36, 37]. Thus, some aspect of the lactational state changes the intracellular response of neurons to afferent input. Furthermore, even though suckling stimulus increases TRH release [8], there is no increase in TSH release [12 and our results], in contrast to the release in prolactin. This has been explained by the inhibitory effect of oxytocin on TSH release [12, 38].

Lactating rats kept with their pups presented higher basal levels of serum corticosterone compared to those that had their pups removed for 8 h (-P), consistent with previous results showing reduced corticosterone levels after 3.5 h of pup removal [39]. In response to cold exposure however, the relative increase in corticosterone levels was higher in dams that had their pups removed than those that kept them. The hyporesponse to stressors observed in lactating dams has been suggested to be due to modifications in neuronal activity induced by pups suckling and not to changes in the sensitivity to glucocorticoid-negative feedback [40]. Glucocorticoids are important modulators of catecholaminergic cells in brainstem and diminish the stress-induced release of norepinephrine in the PVN [41], but the response to α_1 -adrenergic receptor activation is also reduced in corticotropin release hormone-PVN neurons of the lactating dam [42]. The difference observed in corticosterone levels in the two groups of lactating rats (with or without pups removal for 8 h) supports the attenuating effect to stress that pups confer to their mothers [40]. However, the fact that proTRH mRNA levels increased to a similar extent after cold exposure in both groups, and that they still exhibit *c-fos* induction suggests that cold is not a stressor (per se) but an environmental signal lactating dams respond to.

Not being able to find an IEG that would specifically mediate the response to suckling, in order to study if

responsive cells to each stimulus could be recognized, we measured the distribution of proTRH mRNA signal within the PVN. We observed a spatial separation of cold-responsive and suckling-responsive TRH neurons in the anterior PVN. TRH neurons in this area were activated preferentially by cold exposure. Recent evidence indicates that most of these TRH neurons do not project to the median eminence and therefore do not play a hypophysiotropic role [43]. Neurons from this area have been proposed to project to the spinal cord and the dorsal vagal complex [25], but it remains to be shown whether some of these express TRH. The similar response to cold exposure observed in males, virgin females and lactating dams suggests that TRH neurons are not particularly inhibited by lactation but are generally responsive to cold independent of their hormonal milieu. It is interesting to speculate that their sensitivity to cold exposure represents a way that central and peripheral elements of body temperature regulation are coordinated. Specifically, it is possible that TRH neurons whose cell bodies reside in the anterior PVN project to brain regions involved in behavioral thermoregulation, while other PVN TRH neurons control the pituitary-thyroid axis as an effector system maintaining body temperature.

The present data indicate that the TRH neurons in the PVN are subdivided into at least two functional subsets. One, mentioned above, with a neuromodulatory function. The other, with hypophysiotropic function where TRH reaches the adenohypophysis to control TSH or prolactin release. Most hypophysiotropic TRH neurons, recognized by fluorogold retrograde labelling [43], are confined in the periventricular and medial part (*mp*) of the PVN; a high proportion of these neurons coexpress CART (80% in *mp* of medial zone and almost all of the more caudal *mp* in contrast to only 10% of TRH neurons in the anterior PVN). Furthermore, the negative feedback of thyroid hormone on TRHergic cells is absent in anterior parvocellular neurons [44]. However, it is clear that the hypophysiotropic population of neurons contains additional functional subsets. For example, food deprivation/caloric restriction reduces circulating levels of TSH and thyroid hormone [45, 46]; the role of leptin and the influences from the arcuate nucleus are being elucidated through identification of TRH neurons innervated by AGRP [47], α -MSH [48], CART [43] and NPY [49]. These studies indicate that α -MSH innervation differs among PVN subdivisions, with 72% in periventricular neurons, 70% in the anterior part, and only 34 and 47% in *mp* [48]. In our work, we found no clear definition of subsets of neurons in the hypophysiotropic areas that would respond to ei-

ther cold or suckling; they are probably partially intermixed [50]. However, the increase in the number of cells responding to the combined stimuli and the apparent distribution of these responsive cells, albeit it is only qualitatively, points for a subspecialization of hypophysiotropic TRHergic cells that respond either to cold or suckling stimulus. The possibility of distinguishing hypophysiotropic TRHergic neurons by CART coexpression [43], together with the identification of neurotransmitter receptors in subsets of TRH neurons in the PVN, will allow a better understanding of their functional organization.

In conclusion, we provide evidence that supports a functional heterogeneity of TRHergic neurons in the PVN and a method for distinguishing 'responsive' cells, in particular in the anterior zone where TRHergic cells, probably not hypophysiotropic, respond to cold stimulus. The physiologic role of these neurons, probably as part of autonomous signals, remains to be identified.

Acknowledgments

The authors thank Sergio González-Trujillo and Manuel Villa for their assistance in animal handling, Eugenio Bustos for oligonucleotide synthesis, Ricardo Ciria and Abel Linares for computer assistance, and Raul Cardoso (INP) for his photographic work. We acknowledge the gift of rat TSH and prolactin proteins and antibodies to the National Hormone and Pituitary Program supported by NIDDK (USA). This work, presented at the meeting of the Endocrine Society, 2000, was partially funded by CONACYT 33351-N and MRI-35806N, and DGAPA IN-216500. RTZ was funded by US NSF 9514835. E.S. was a recipient of a DGEP-UNAM scholarship.

References

- Lechan RM, Toni R: Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system; in Charles B, Nemeroff C (eds): *Neuroendocrinology*. Boca Raton, CRC Press, 1992, pp 279–330.
- Haisenleder DJ, Orotlano GA, Dalkin AC, Marschall JC: Differential actions of TRH pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1992;130:2915–2923.
- Rondeel JM, de Greef WJ, van der Schoot P, Karels B, Klootwijk W, Visser TJ: Effect of thyroid status and paraventricular area lesions on the release of thyrotropin-releasing hormone and catecholamines into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 1988;123:523–527.
- Grosvenor CE, Mena F: Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 1980;107:863–868.
- Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H: Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 1983;37:225–228.
- Hefco E, Krulich L, Illner P, Larsen PR: Effect of acute exposure to cold on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology* 1975;97:1185–1195.
- De Greef WJ, Visser TJ: Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocrinol* 1981;91:213–223.
- Fink G, Koch Y, Ben-Aroya N: TRH in hypophysial portal blood: Characteristics of release and relationship to thyrotropin and prolactin secretion; in Griffiths EC, Bennett GW (eds): *Thyrotropin-Releasing Hormone*. New York, Raven Press, 1983, pp 127–144.
- Zoeller RT, Simongi A, Bulnario O, Fletcher KL: Effects of acute ethanol administration and cold exposure on the hypothalamic pituitary axis. *Endocrine* 1995;3:39–47.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P: Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1993;58:140–145.
- Rage F, Lazaro JB, Benyassi A, Arancibia S, Tapia-Arancibia L: Rapid changes in somatostatin and TRH mRNA in whole rat hypothalamus in response to acute cold exposure. *J Neuroendocrinol* 1994;6:19–23.
- Van Haasteren GA, van Toor H, Klootwijk W, Handler B, Linkels E, van der Schoot P, van Ophemert J, de Jong FH, Visser TJ, de Greef WJ: Studies on the role of TRH and corticosterone in the regulation of prolactin and thyrotropin secretion during lactation. *J Endocrinol* 1996;148:325–336.
- Uribe RM, Pérez-Martínez L, de Lourdes Covarrubias M, Gómez O, Covarrubias L, Charli JL, Joseph-Bravo P: Phorbol ester or cAMP enhance thyrotropin-releasing hormone mRNA in primary cultures of hypothalamic cells. *Neurosci Lett* 1995;201:41–44.
- Pérez-Martínez L, Carreón-Rodríguez A, González-Alzati ME, Morales C, Charli JL, Joseph-Bravo P: Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: Interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* 1998;68:345–354.
- Arancibia S, Rage F, Astier H, Tapia-Arancibia L: Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology* 1996;64:257–267.
- Barofsky AL, Taylor J, Massari VJ: Dorsal raphe-hypothalamic projections provide the stimulatory serotonergic input to suckling-induced prolactin release. *Endocrinology* 1983;113:1894–1903.
- Larsen PJ, Hay-Schmidt A, Vrang N, Mikkelsen JD: Origin of projections from the mid-brain raphe nuclei to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat: A combined retrograde and anterograde tracing study. *Neuroscience* 1996;70:963–988.
- Baffi JS, Palkovits M: Fine topography of brain areas activated by cold stress. A fos immunohistochemical study in rats. *Neuroendocrinology* 2000;72:102–113.
- Shioda S, Nakai Y: Medullary synaptic inputs to thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing neurons in the hypothalamus: An ultrastructural study combining WGA-HRP anterograde tracing with TRH immunocytochemistry. *Brain Res* 1993;625:9–15.
- Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL: Segregation of the intra- and extrahypothalamic neuropeptide Y and catecholaminergic inputs on paraventricular neurons, including those producing thyrotropin-releasing hormone. *Regul Pept* 1998;75/76:117–126.
- Tapia-Arancibia L, Arancibia S, Astier H: Evidence for α_1 -adrenergic stimulatory control of in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat median eminence: In vivo corroboration. *Endocrinology* 1985;116:2314–2319.
- Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Astier H, Assenmacher I: Physiological evidence for α_1 -adrenergic facilitatory control of the cold-induced TRH release in the rat, obtained by push-pull cannulation of the median eminence. *Neurosci Lett* 1989;100:169–174.
- Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli JL: Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 1991;54:493–498.
- Palkovits M, Brownstein MJ: *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*. Amsterdam, Elsevier Science, 1988.
- Swanson LW, Kuypers HG: The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 1980;194:555–570.
- Sánchez E, Charli JL, Morales C, Corkidi G, Seidah NG, Joseph-Bravo P, Uribe RM: Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin-releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus. *Brain Res* 1997;761:77–86.
- Lechan RM, Wu P, Jackson IM, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH: Thyrotropin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science* 1986;231:159–161.
- Milbrandt J: A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 1987;238:797–799.
- Sakai M, Okuda A, Hatayama I, Sato K, Nishi S, Muramatsu M: Structure and expression of the rat c-jun messenger RNA: Tissue distribution and increase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res* 1989;49:5633–5637.
- Cohen DR, Curran T: fra-1: A serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a fos-related antigen. *Mol Cell Biol* 1988;8:2063–2069.
- Curran T, Gordon MB, Rubino KL, Sambucetti LC: Isolation and characterization of the *c-fos* (rat) cDNA and analysis of post-translational modification in vitro. *Oncogene* 1987;2:79–84.
- Kovacs KJ, Sawchenko PE: Sequence of stress-induced alterations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 1996;16:262–273.
- Legradi G, Holzer D, Kapcala LP, Lechan RM: Glucocorticoids inhibit stress-induced phosphorylation of CREB in corticotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1997;66:86–97.
- Segerson TP, Hoefler H, Childers H, Wolfe HJ, Wu P, Jackson IM, Lechan RM: Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization. *Endocrinology* 1987;121:98–107.
- Wintrip N, Nance DM, Wilkinson M: The effect of lactation on induced Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1997;754:113–120.
- Fénelon VS, Poulain DA, Theodosis DT: Oxytocin neuron activation and fos expression: A quantitative immunocytochemical analysis of the effect of lactation, parturition, osmotic and cardiovascular stimulation. *Neurosci* 1993;53:77–89.

113

- 37 Fénelon VS, Theodosis DT, Poulain DA: Fos synthesis in identified magnocellular neurons varies with phenotype, stimulus, location in the hypothalamus and reproductive state. *Brain Res* 1994;662:165-177.
- 38 Frawley LS, Denis AL, Neill JD: Oxytocin attenuates TRH-induced TSH release from rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* 1985;40:201-204.
- 39 Walker CD, Lightman S, Steele MK, Dallman MF: Suckling is a persistent stimulus to the adrenocortical system of the rat. *Endocrinology* 1992;130:115-125.
- 40 Walker CD: Modifications neuroendocriniennes reliées à l'activité de l'axe corticotrope au cours de la lactation chez le rat. *Ann Endocrinol (Paris)* 1995;56:169-172.
- 41 Pakak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS: Stress-induced norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: In vivo microdialysis studies. *Front Neuroendocrinol* 1995;16:89-150.
- 42 Windle RJ, Brady MM, Kumanandam T, Da Costa APC, Wilson BC, Harbuz M, Lightman SL, Ingram CD: Reduced response of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to α_1 -agonist stimulation during lactation. *Endocrinology* 1997;138:3741-3748.
- 43 Fekete C, Mihaly E, Luo LG, Kelly J, Clausen JT, Mao Q, Rand WM, Moss LG, Kuhar M, Emerson CH, Jackson IM, Lechan RM: Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci* 2000;20:9224-9234.
- 44 Dyess EM, Segerson TP, Liposits Z, Paull WK, Kaplan MM, Wu P, Jackson IM, Lechan RM: Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1988;123:2291-2297.
- 45 Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL: Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* 1991;129:2714-2718.
- 46 Legrady G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM: Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997;138:2569-2576.
- 47 Legrady G, Lechan RM: Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1999;140:3643-3652.
- 48 Fekete C, Legrady G, Mihaly E, Tatro JB, Rand WM, Lechan RM: α -Melanocyte stimulating hormone prevents fasting-induced suppression of corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci Lett* 2000;289:152-156.
- 49 Toni R, Jackson IM, Lechan RM: Neuropeptide-Y-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1990;126:2444-2453.
- 50 Swanson LW, Sawchenko PE: Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology* 1980;31:410-417.

Research report

Expression of the proprotein convertases PC1 and PC2 mRNAs in thyrotropin releasing hormone neurons of the rat paraventricular nucleus of hypothalamus

Edith Sánchez ^a, Jean-Louis Charli ^{a,*}, Claudia Morales ^a, Gabriel Corkidi ^b, Nabil G. Seidah ^c,
Patricia Joseph-Bravo ^a, Rosa Maria Uribe ^a

^a *Departamento de Genética y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor., A.P. 510-3, Mexico 62271*

^b *Centro de Instrumentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F., Mexico*

^c *J.A. DeSeve Laboratories of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, Montreal, Que., Canada*

Accepted 25 February 1997

Abstract

PC1 and PC2 are subtilisin-like processing enzymes capable of cleaving thyrotropin releasing hormone (TRH) precursor (pro-TRH) at paired basic residues *in vitro*. In the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), pro-TRH is synthesized to control adenohipophysial thyrotropin and prolactin release. Biochemical and immunological approaches have shown that in the hypothalamus, pro-TRH is extensively cleaved at pairs of basic amino acids. We quantified, by two different approaches, *in situ* hybridization (ISH) on consecutive cryostat sections or double label ISH, the proportion of PVN TRH neurons containing either PC1 or PC2 mRNAs. Both techniques gave similar results: PC2 mRNA was present in 60–70% of TRH neurons, and PC1 mRNA in 37–46%. Values were similar in the anterior and medial parts of the parvocellular PVN. TRH neurons containing either PC1 or PC2 mRNA were found throughout the areas containing TRH cells without any evidence of anatomical segregation. These results suggest a biochemical heterogeneity in PVN TRH biosynthetic machinery. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Thyrotropin releasing hormone (TRH); Biosynthesis; Processing; Convertase; PC1; PC2; Hybridization, *in situ*; Hypothalamus; Paraventricular nucleus

1. Introduction

Thyrotropin releasing hormone (TRH, pGlu-His-ProNH₂) neurons localized in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus control the biosynthesis and release of thyrotropin and prolactin. Rat TRH precursor (pro-TRH) contains 5 Gln-His-Pro-Gly sequences flanked by pairs of basic amino acids and cryptic peptides [24].

Several mammalian subtilisin-like endoproteases (proprotein convertases, PCs), cleaving at dibasic sites, have been characterized by their sequence homology to Kex2, a yeast endoprotease [26]. They include furin, PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/PC6, PACE4 [33] and PC7 [35]. Some of these, such as furin, mainly cleave precursors released by

the constitutive pathway [5]. PC1 and PC2 mRNAs are enriched in neural and endocrine tissues [3,20,30,34]. Their brain distribution is not homogeneous [30]. *In vitro* studies have demonstrated that either PC1 or PC2 can efficiently cleave pro-TRH albeit with different kinetics and optimal pH [18,27].

Endocrine cell lines expressing either PC1 or PC2 process pro-TRH efficiently [36]. Processing of TRH precursor *in vivo* has been analyzed with biochemical and immunological techniques. Pro-TRH processing at paired basic amino acids is extensive in the hypothalamus [8,41,42]. With the aid of antibodies directed at elongated forms of TRH, differential maturation was observed within rat brain regions; the hypothalamus, for example, presents low proportions of prepro-TRH (154–169) and prepro-TRH (172–199), while the olfactory bulb contains more of these and other partially processed forms having the Arg–Arg pair [6,12,13].

* Corresponding author. Fax: +52 (7) 317-0805; E-mail: charli@ibt.unam.mx

We have investigated the mode of regulation of TRH biosynthesis and provided evidence for a fast and transient increase of TRH mRNA in the PVN upon neuronal stimulation, as occurs during exposure to the cold or suckling [40]. Coordinated regulation of mRNA for processing enzymes and their substrates has been observed in some cases [3,17]. As a prerequisite to determine whether this occurs for pro-TRH, we determined the percentage of PC1 or PC2 mRNA localization in TRH neurons of the PVN. We followed two strategies: *in situ* hybridization (ISH) using consecutive sections labelled with distinct probes or, double label ISH. With both techniques we detected a higher proportion of TRH neurons containing PC2 mRNA than those that had PC1 mRNA. This suggests that PVN TRH neurons are heterogeneous with regard to their complement convertases.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Wistar rats (250–350 g) were maintained under standard conditions (12 h light/dark cycle; water and food *ad libitum*) and killed by decapitation between 10.00 and 13.00 h. The brain was removed and frozen immediately to be stored at -70°C .

2.2. Oligonucleotide probe preparation and labelling

48-mer oligonucleotides for rat PC1 (bases 1234–1281 and 1744–1791) and PC2 (1366–1413 (A) and 1998–2045 (B)) [20], for rat corticotrophin releasing factor (CRF) (496–543) [44] and a 50-mer for TRH (317–367) [23] were synthesized in our Institute on an Applied Biosystem 318A synthesizer. Oligonucleotides were labelled with [^{35}S]dATP (Amersham, 1000 Ci/mmol) using deoxynucleotidyl terminal transferase (Boehringer); specific activity: $6\text{--}8 \times 10^8$ cpm/ μg .

2.3. cRNA probe synthesis and labelling

cRNA probes were generated from rat cDNAs subcloned in Bluescript (+) (for PC1 and PC2) or pGEM2 (for TRH). ^{33}P - or ^{35}S -PC1 (cDNA segment 715–1206) and PC2 (878–1326) cRNA probes were synthesized using T7 RNA polymerase (Boehringer) and ^{33}P - or ^{35}S - αUTP (Amersham, 1000–2200 Ci/mmol). Specific activity of cRNAs was $1\text{--}2 \times 10^9$ cpm/ μg . Digoxigenin-cRNA probe for TRH was transcribed from the complete cDNA sequence [24] using T7 RNA polymerase and digoxigenin-11-UTP (Boehringer).

2.4. Single label *in situ* hybridization histochemistry (ISH)

Frozen coronal brain sections (10 μm) of the anterior parvocellular (APa) and medial parvocellular (MPa) PVN

and, sections from the pituitary, were cut on a cryostat, thaw-mounted onto slides (Superfrost/Plus, Fisher) and stored at -70°C . Sections were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-saline buffer (PBS) for 15 min, rinsed in PBS and treated with 0.25% acetic anhydride in 0.1 M triethanolamine, $4 \times \text{SSC}$ (pH 8.0) for 10 min. After dehydration in increasing concentrations of ethanol they were delipidated in chloroform for 10 min, rinsed in ethanol, and air-dried.

For oligonucleotide probes, sections were incubated for 15 h at 42°C in hybridization buffer: $4 \times \text{SSC}$, 50% deionized formamide, $1 \times \text{Denhard's}$ ($100 \times = 0.5\%$ Ficoll, 0.5% polyvinyl pyrrolidone, 0.5% bovine albumin), 500 $\mu\text{g/ml}$ sheared salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate, 50 mM DTT, 250 $\mu\text{g/ml}$ poly A, 100 mM Na phosphate buffer (pH 7.4), 1% sarcosyl, 250 $\mu\text{g/ml}$ tRNA and ^{35}S -labelled oligonucleotide probe at a final concentration of 1 pmol/ml. This probe concentration gave the best signal to noise ratio. Following incubation, sections were washed (for TRH with: 2×30 min $1 \times \text{SSC}$ –50% formamide at 45°C , 4×30 min $0.1 \times \text{SSC}$ –0.02% SDS at 45°C ; PC1: 2×30 min $2 \times \text{SSC}$ –50% formamide at 42°C , 2×30 min $0.1 \times \text{SSC}$ –0.02% SDS at 42°C , 2×30 min $0.1 \times \text{SSC}$ –0.02% SDS at 50°C ; PC2: 2×30 min $1 \times \text{SSC}$ –50% formamide at 45°C , 2×30 min $0.1 \times \text{SSC}$ –0.02% SDS at 45°C , 2×30 min $0.1 \times \text{SSC}$ –0.02% SDS at 50°C ; CRF: 2×10 min $1 \times \text{SSC}$ at RT, 4×15 min $2 \times \text{SSC}$ –50% formamide at 40°C , 2×30 min $1 \times \text{SSC}$ at RT), dehydrated with ethanol and exposed to hyperfilm β -max autoradiography film (Amersham) at RT; they were later dipped in Amersham emulsion to visualize the mRNA cellular signal; silver grains were developed with D19 (Kodak). Sections were counterstained with hematoxylin-eosin and mounted with S/P Accu-mount 60 (Baxter).

For cRNA probes, 8 ng ^{33}P - or ^{35}S -labelled probes were added in 25 μl hybridization buffer (50% formamide, $2 \times \text{SSC}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ tRNA, $1 \times \text{Denhard's}$, 50 mM DTT, 500 $\mu\text{g/ml}$ single-stranded salmon sperm DNA, 10% dextran sulfate) and the hybridization carried out at 52°C during 6–12 h. The sections were washed for 2×15 min with $1 \times \text{SSC}$ at RT, 5 min and 20 min with $2 \times \text{SSC}$ –50% formamide at 52°C , 2×5 min $2 \times \text{SSC}$ at RT, 30 min with RNase A (Boehringer; 50 $\mu\text{g/ml}$)– $2 \times \text{SSC}$ –1 mM EDTA pH 8.0 at 37°C , 2×3 min $2 \times \text{SSC}$ at RT, 15 min $2 \times \text{SSC}$ –50% formamide at 52°C . Finally sections were dehydrated with ethanol and exposed as above.

2.5. Specificity controls

Specificity was corroborated by various criteria (not shown): (1) total displacement of oligonucleotide signal with 10 pmol/ml of cold probe and absence of displacement by 10 pmol/ml of a non-related oligonucleotide in the hybridization mixture; (2) the brain or pituitary macroscopic hybridization patterns were similar with either probe

of the same message; (3) these patterns were identical to those previously reported; and (4) microscopic analysis demonstrated a cell distribution in PVN in agreement with these reports [30,31,43].

2.6. Double-label *in situ* hybridization

Coronal cryostat sections (12 μm) throughout the APa and MPa PVN were fixed and defatted as described above. For each section, 100 ng of digoxigenin-labelled TRH and 8 ng ^{35}S - or ^{33}P -labelled PC1 or PC2 cRNA probes were added in 25 μl of RNA probe hybridization buffer. Sections were then hybridized and washed as above. To visualize the digoxigenin probe, they were incubated at RT 1 h with gentle mixing in 5% blocking reagent (Boehringer) in PBS, 30 min in 100 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaCl (buffer A)-0.3% Triton X-100-2% BSA, washed twice in buffer A for 10 min and incubated in antidigoxigenin-peroxidase [Boehringer] (1:100 in buffer A-0.3% Triton X-100-1% BSA) for 36–48 h at 4°C. Sections were washed twice in buffer A for 10 min and incubated 15–30 min with 0.02% 3,3'-diaminobenzidine-0.02% v/v hydrogen peroxide (30%) in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6. Reaction was stopped by incubation for 3 min in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6, 300 mM ammonium acetate. Finally sections were rinsed in water, dehydrated in ethanol, dipped in Amersham emulsion and processed as for single label ISH except there was no final counterstaining.

2.7. Digital image analysis

Neuron counting was performed using a HISTOSCAN.S image analyser (Biocom, France) [14,21]. This system allowed us the combination of different magnifications of the microscope by tracing the contours of macro-structures such as PVN and third ventricle (IIIIV) at low magnification (10 \times), and pointing manually to each neuron at high magnification (100 \times) without the risk of counting any element twice. Cells labelled with radioactive probes were taken as positive when a minimum of 8 grains (over 3 \times the background) was detected; a mark was made in the center of their nucleus. All positive cells in the PVN zone were registered in the image analyzer and the resulting map and data stored.

(a) Single label ISH on consecutive sections: The analysis was performed either manually or automatically. For the manual analysis, once the section was processed, a laser high resolution cartography was printed out [IIIIV size: 15 cm]. IIIIV contours were used as the main reference for juxtaposition of consecutive maps. Pairs of maps with IIIIV contours insufficiently similar were not analysed. The printed laser maps were manually overlapped for a visual marking and counting of the total number of superposing cells (less than 0.5 mm difference on the map).

We have developed an additional software for overlaying cartographies and colocalization counting. A first coarse

overlapping of consecutive maps was performed automatically with the program, taking the IIIIV Ferét's biggest diameter and its respective orientation as criteria reference; as a second step, fine adjustment for the best visual overlay was possible by introducing manually extra numeric values of x , y displacements and rotations. Positive cells were automatically identified by determining a circular tolerance area (radius of 7 microns) around the mark of each labelled cell; coincident cells were those for which these areas touch.

More than 80% of the colocalized cells identified in one way were also detected the other way around. In each case we determined the percentage of coincidental events, i.e. the percentage of coinciding cells detected in 2 adjacent maps compared to the number of TRH positive cells in one of the two sections. Both methods generated very similar percentages of coincidence values; furthermore, a visual analysis of some printed video images of coinciding cells detected through the maps overlapping confirmed positive identifications (not shown).

(b) Double label ISH: cells were considered TRH-positive whenever they presented a strong brown color. Maps with cells positive for TRH mRNA and either PC mRNA were generated and reproduced on a laser high resolution printer.

3. Results

3.1. Distribution of TRH, PC1 and PC2 mRNA cells in the PVN

TRH mRNA was detected in regions including the hypothalamic PVN (Fig. 1), the thalamic reticularis nucleus and the hippocampus. TRH neurons were present throughout the rostro-caudal extension of PVN mainly in the parvocellular zone; number of cells per section was similar in the APa and MPa subdivisions: 128 ± 7 ($n = 13$) and 116 ± 6 ($n = 24$) respectively (means \pm S.E.M.). They were dispersed in the anterior parvocellular part (not shown) and their position varied along the rostro-caudal axis in the medial parvocellular part. In the anterior MPa, they were more concentrated along the IIIIV (Figs. 1 and 3); in the medial, more dispersed with a tendency to be grouped dorsally and in the caudal zone, concentrated in the dorsal lateral part. Autoradiographic signal for TRH mRNA was stronger in neurons from the MPa zone, in particular in the anterior MPa (Fig. 2).

PC1 mRNA was detected in adenohypophysis, intermediate lobe (IL) of the hypophysis, some layers of cortex, hippocampus, supraoptic nucleus of hypothalamus (not shown) and PVN (Fig. 1). PC1 neurons were present throughout the rostro-caudal extension of PVN, in the parvo- and magnocellular subdivisions, with a higher density in the magnocellular part (not shown). Their number was 4-fold higher than that of TRH neurons (Table 1) and

similar in the anterior and medial parts (not shown). Cells containing PC1 mRNA showed in general, few silver grains compared to TRH neurons (Fig. 2) except in the magnocellular zone, in particular in the anterior MPA, where PC1 signal was intense (Fig. 1).

PC2 mRNA signal was intense in IL and low in adeno-hypophysis. In the brain sections studied, PC2 mRNA was mainly found in high concentrations in thalamic nuclei, some layers of cortex, hippocampus (not shown) and PVN (Fig. 1). PC2 neurons were present throughout the rostro-caudal extension of parvocellular and magnocellular subdivisions of PVN with a slight enhancement of their density in the magnocellular part (Figs. 1 and 3). Their number was 5-fold higher than that of TRH neurons (Table 1) and similar in the anterior and medial parts (not shown). PC2 mRNA positive cells were more intensely labelled than PC1 cells throughout most of the PVN area (Fig. 2); intensity per PC2 cell increased in the rostrocaudal direction (not shown).

3.2. Single label ISH on consecutive sections

In order to study the localization of converting enzyme mRNA in TRHergic cells, we first used ISH in consecutive sections. To determine the maximum number of colocalization events which could be detected with this approach, we hybridized some pairs of consecutive sections of the medial zone with TRH probe. We found that 13% of TRH

cells detected in one section coincided in the other one (Table 1). To quantify the maximum percentage of coincidental events due to imprecise overlapping, we took advantage of the fact that CRF cells are numerous in the PVN but do not significantly colocalize with parvocellular TRH neurons [10]. In coronal sections at PVN level, CRF mRNA positive cells were only detected in the PVN. CRF cells were detected in PVN magno- and parvocellular parts throughout the rostro-caudal axis (not shown); in the medial part their number was twice that of TRH neurons (Table 1). CRF mRNA positive cells were as intensely labelled as TRH cells (Fig. 2). We detected 2.9% of medial PVN TRH neurons coinciding with CRF mRNA cells (Table 1). This set the upper value for overestimation due to imprecise overlapping, although some of these coincidental events might be real [10].

To determine the percentage of TRH cells containing either PC1 or PC2 mRNA, we used ISH on consecutive sections from the medial PVN region. One section was labelled with pro-TRH probe and the next one, with either PC1 or PC2 probes. PC1 probe coincided with 7.6% of TRH cells while PC2 mRNA, with 10% (Table 1). If we take into account a maximum coincidence error of 3% (CRF–TRH) and a maximum signal of 13% (TRH–TRH), the data suggest that approximately 70% of TRH cells express PC2 mRNA while 46% PC1 mRNA. There was no preferential distribution of colocalization events (Fig. 3).

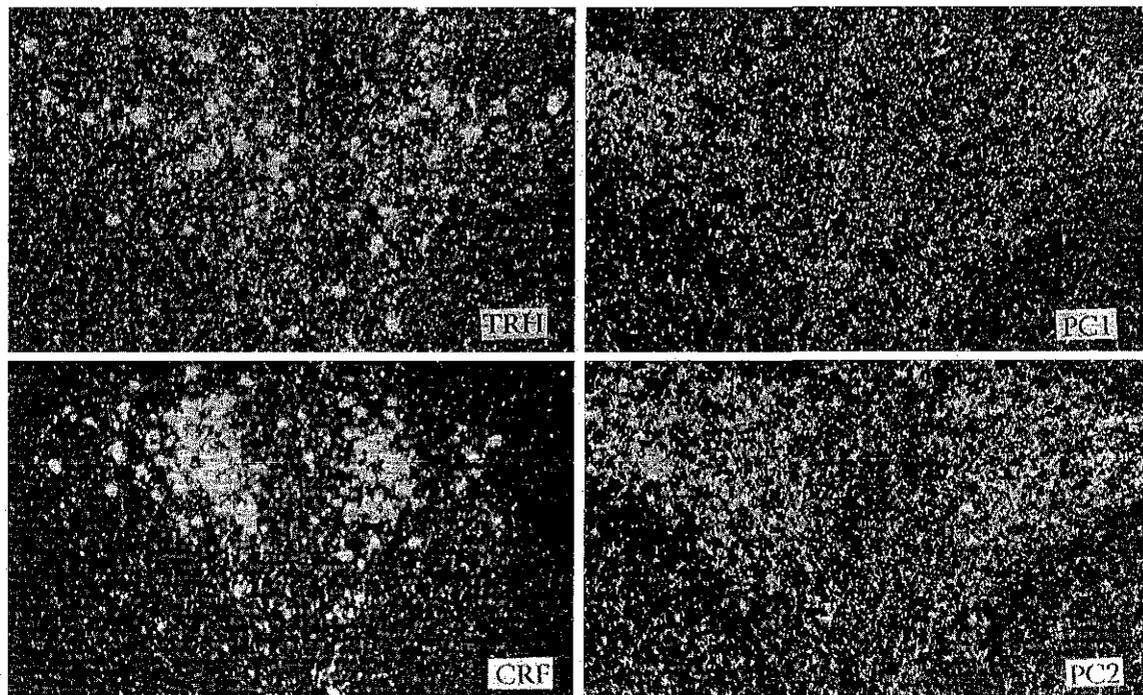


Fig. 1. Distribution of TRH, CRF, PC1 or PC2 mRNA in the anterior MPA. PVN sections were hybridized with oligonucleotide or cRNA probes, dipped in emulsion and developed. Photomicrographs were obtained under semi-dark field illumination so that white dots correspond to silver grains accumulating on positive cells. Probes and exposure times: TRH: ^{35}S oligonucleotide, 15 days; CRF: ^{35}S oligonucleotide, 17 days; PC1: ^{33}P cRNA, 5 days; PC2: ^{35}S oligonucleotides A and B, 15 days. Original magnification: $10\times$.

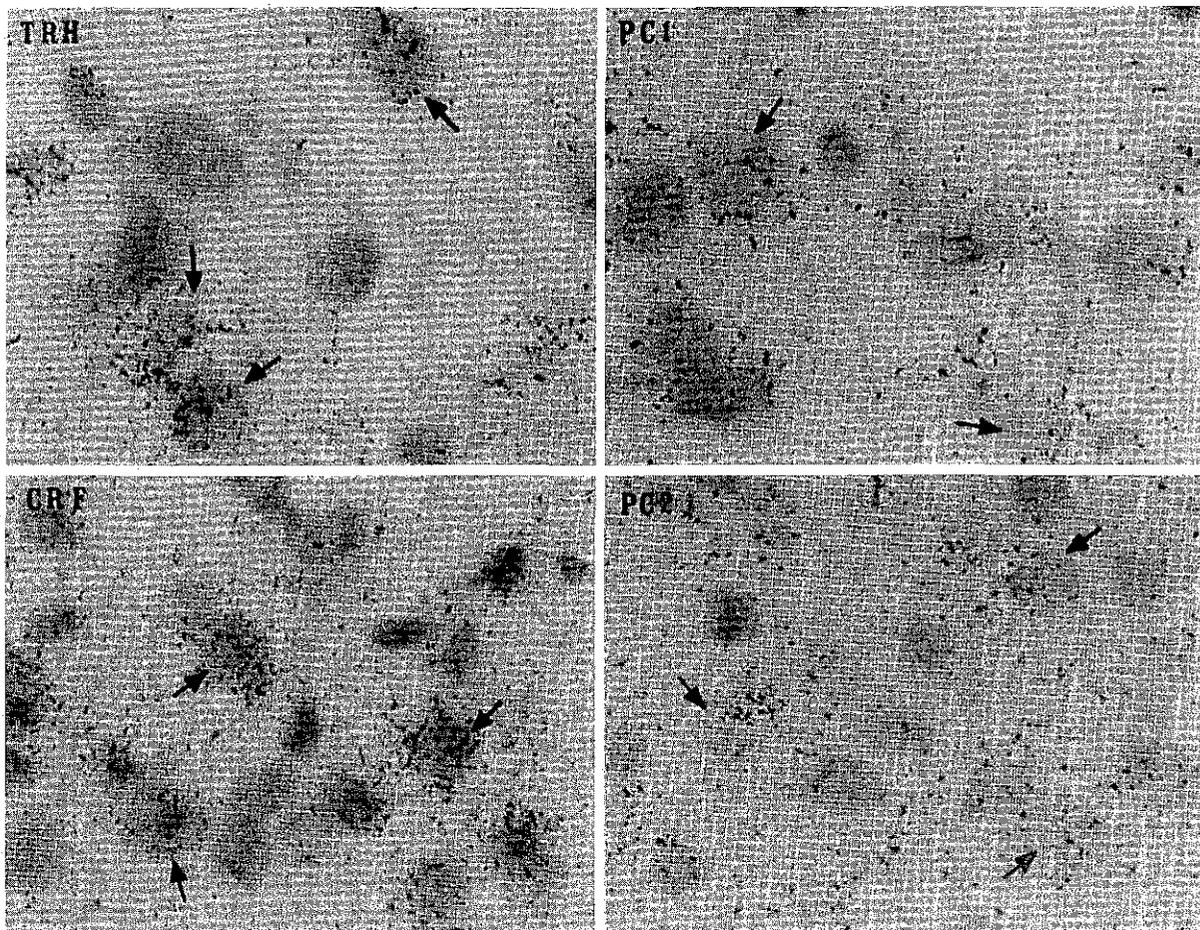


Fig. 2. TRH, CRF, PC1 and PC2 mRNA expressing cells in the medial parvocellular zone of PVN. PVN sections were hybridized with the following probes and exposure times: TRH: ^{35}S oligonucleotide, 15 days; CRF: ^{35}S oligonucleotide, 17 days; PC1: ^{33}P cRNA, 5 days; PC2: ^{35}S oligonucleotides A and B, 15 days. Sections were observed under bright field illumination. Some positive cells are indicated by arrows. Original magnification: $100\times$.

3.3. Double label ISH

Double label ISH was performed using TRH probe labelled with digoxigenin and PC1 or PC2 probes labelled with ^{35}S (first experiment) or ^{33}P (second experiment). Similar results were obtained in both experiments. The distribution pattern of TRH mRNA expressing cells in the subdivisions detected with the digoxigenin-labelled probe was the same as detected with the radiolabelled probe (Fig. 4); however their number was lower than detected with radioactive probes. The signal showed a perinuclear localization in many positive cells (Fig. 5), as reported for TRH mRNA [45]. In order to approach the upper limit of detection of PC mRNAs in TRH neurons, long exposure times were used, allowing an adequate signal to noise distinction. A substantial proportion of TRH cells contained either PC1 or PC2 mRNA; TRH cells negative for either PC had no more grains than background (Fig. 5). This supports the values for the proportion of TRH cells containing either PC1 or PC2 mRNA being maximal. Many cells negative for TRH contained either PC mRNA

Table 1

Some TRH neurons coincide with PC1 or PC2 mRNA neurons in the medial PVN: analysis by ISH on consecutive sections

Cell type	Number of cells	Map pairs analysed per section	% coincidence
TRH	116 ± 6.0 (24)	TRH-TRH (4)	13.0 ± 2.7
CRF	250 ± 30 (7)	TRH-CRF (9)	2.9 ± 0.2
PC1	515 ± 53 (3)	TRH-PC1 (4)	7.6 ± 1.0
PC2	630 ± 50 (5)	TRH-PC2 (5)	10.0 ± 1.0

Pairs of consecutive coronal brain sections ($10\ \mu\text{m}$) at the medial parvocellular (Mpa) PVN level were hybridized with a TRH-specific probe for one section and the following one with a probe specific either for TRH, CRF, PC1 or PC2 mRNAs (TRH: ^{35}S oligonucleotide, exposure: 15 days; CRF: ^{35}S oligonucleotide, 17 days; PC1: ^{33}P cRNA, 5 days; PC2: ^{35}S oligonucleotides A and B, 15 days). Neuron counting was performed using a HISTOSCAN.S image analyser (Biocom, France). All positive cells in the PVN zone were marked in the image analyzer and the resulting map and data stored. Maps were overlapped for counting and marking of the total number of cells and superposing cells. The percentage of coincidental events refers to the percentage of coinciding cells detected in two adjacent maps compared to the number of TRH-positive cells in one of the two sections. Data are mean \pm S.E.M. (number of independent determinations).

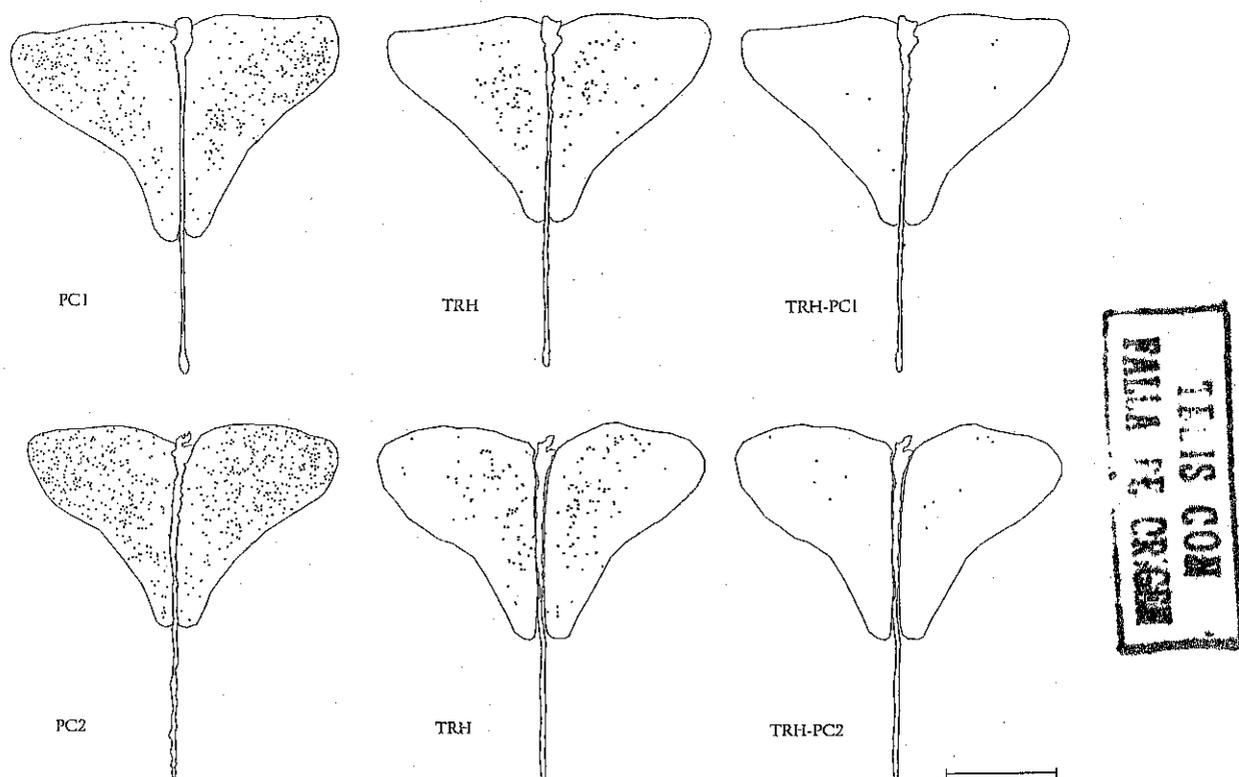


Fig. 3. Maps of TRH, PC1, PC2 and coinciding TRH-PC1 or TRH-PC2 mRNA expressing cells detected by ISH on consecutive sections in the medial PVN (anterior MPA). Pairs of consecutive PVN sections ($10\ \mu\text{m}$) were hybridized with the following probes and exposure times: TRH: ^{35}S oligonucleotide, 15 days; PC1: ^{33}P cRNA, 5 days; PC2: ^{35}S oligonucleotides A and B, 15 days. Neuron counting was performed using a HISTOSCAN.S image analyser (Biocom, France). All positive cells in the PVN zone were marked in the image analyzer and the resulting map and data stored. The maps were overlapped for counting and marking the superposing cells. The resulting maps were printed out on a laser high resolution printer. Bar size = $500\ \mu\text{m}$. The figure represents two of the various consecutive pairs analysed.

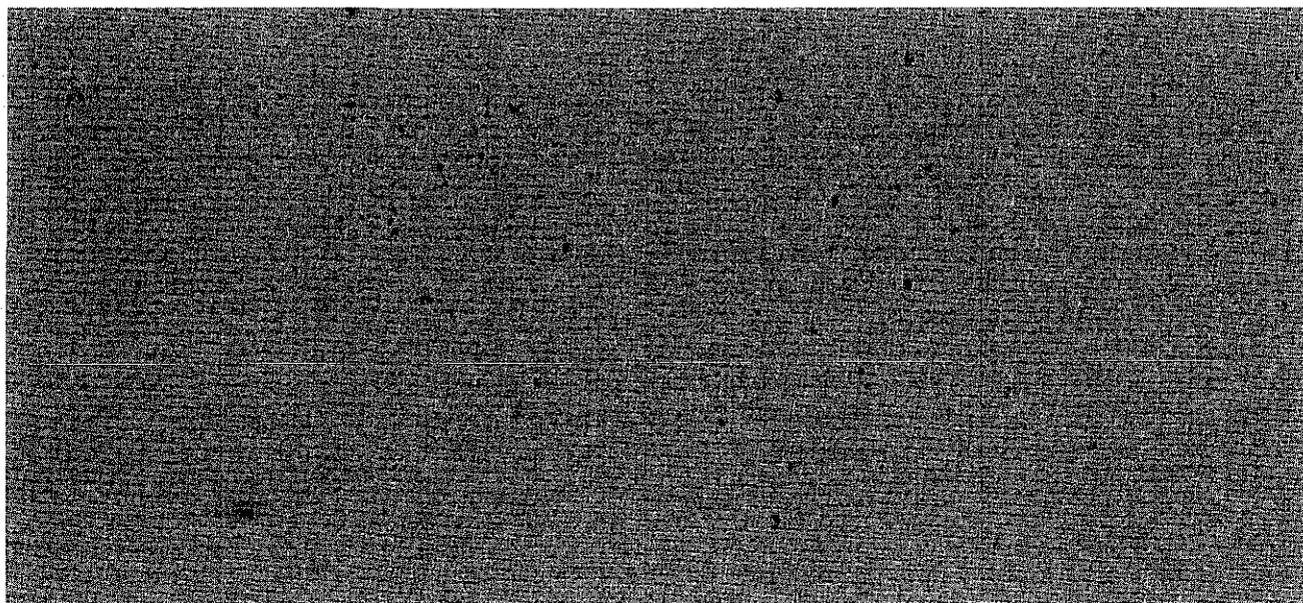


Fig. 4. Distribution of TRH mRNA in the anterior MPA with a digoxigenin-labelled probe. PVN sections were hybridized with $100\ \text{ng}$ of digoxigenin-labelled TRH cRNA probe. To visualize the digoxigenin probe, they were incubated in antidigoxigenin-peroxidase, washed and incubated with a solution containing 3,3'-diaminobenzidine, 0.02% (v/v) hydrogen peroxide (30%) and 0.2% $(\text{NH}_4)_2\text{Ni}(\text{SO}_4)_2$ for 10 min. Sections were observed under bright field illumination. Original magnification: $10\times$.

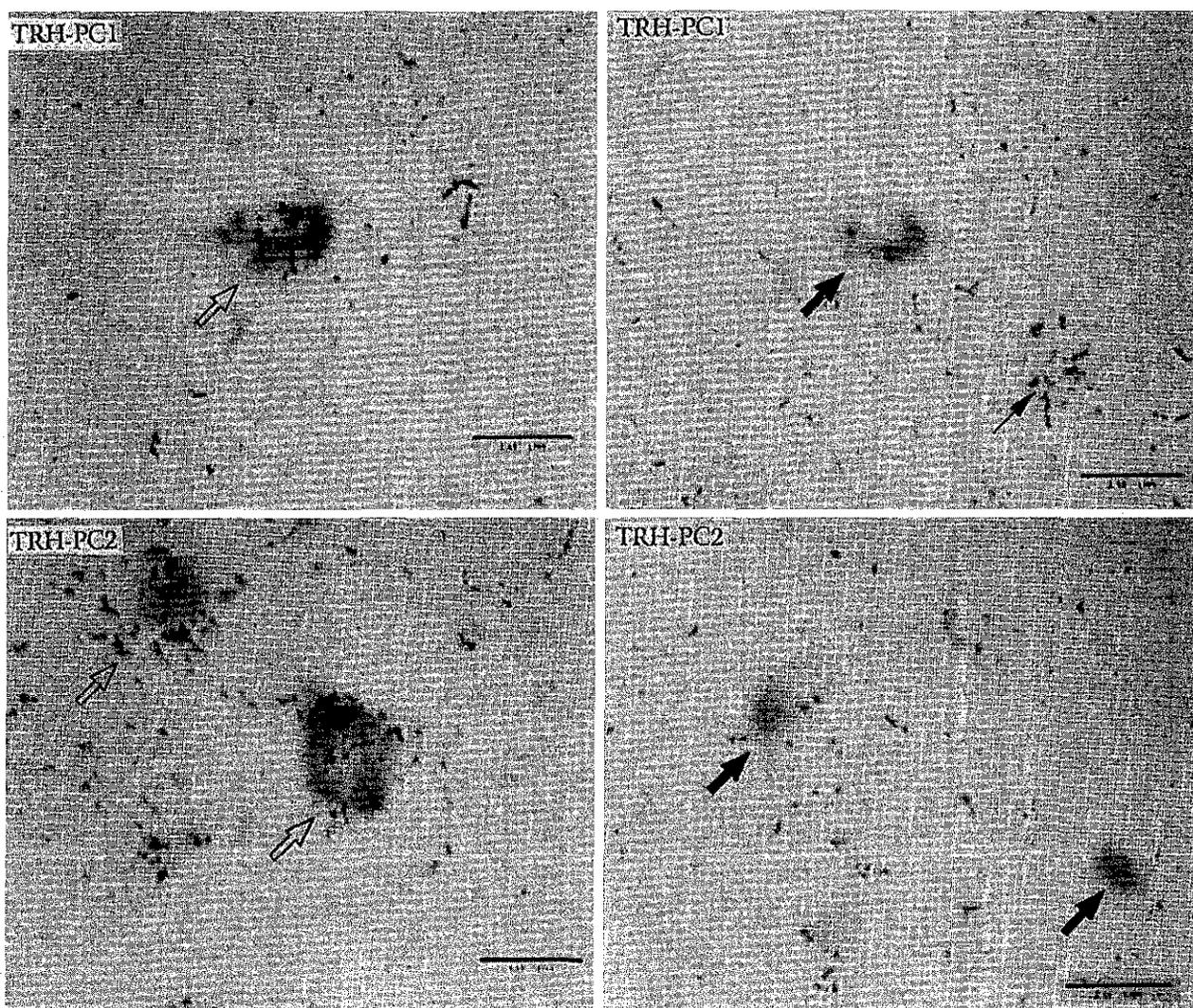


Fig. 5. Parvocellular PVN TRH positive cells contain PC1 or PC2 mRNA. Sections were hybridized with a digoxigenin-labelled TRH cRNA probe and either one of the PC mRNAs probes: PC1: ^{33}P cRNA, 8 days; PC2: ^{35}S cRNA, 6.5 days. Photomicrographs of double ISH performed with probes against TRH and either PC1 (upper panels) or PC2 mRNA (lower panels). Cells were observed with a transmitted light microscope. TRH positive cells are identified by their dark color; PC positive cells, by the accumulation of black silver grains. Double-labelled cells are indicated by hollow arrows; PC-negative, TRH-positive cells by black arrows; TRH-negative, PC-positive cells by thin arrows. Original magnification: $100\times$. Bar size = $10\ \mu\text{m}$.

(Fig. 5). Quantification of the experiments did not reveal a difference in the percentage of double labelled cells between the anterior and medial zones but confirmed that PC1 mRNA was localized in fewer TRH cells than PC2 mRNA (Table 2). As shown with the consecutive sections analysis, double-labelled cells were not anatomically restricted but could be detected throughout the areas occupied by TRH positive cells (not shown).

We have compared the percentages of colocalization of PCs mRNA in PVN TRH neurons with that in TRH neurons localized between PVN and fornix, cells previously observed by other groups [31]. These TRH cells were more extensively double-labelled than those in PVN, with PC2 mRNA again present in higher number of TRH neurons than PC1 mRNA (Table 2).

Table 2

More TRH neurons contain PC2 than PC1 mRNA in the anterior (APa) and medial (MPa) PVN and a zone between PVN and fornix (PVN-F); analysis by double-label ISH

Region	% TRH cells with PC1 mRNA	% TRH cells with PC2 mRNA
APa PVN	37 ± 7.9 (3)	60 ± 5.4 (4)
MPa PVN	37 ± 3.2 (12)	61 ± 3.1 (13)
PVN-F	70 ± 4.1 (13)	84 ± 4.0 (16)

Double ISH was performed on $12\ \mu\text{m}$ coronal sections through PVN with probes against TRH and either PC1 or PC2 mRNA. Sections were hybridized with a digoxigenin-labelled TRH cRNA probe and either one of the PC mRNA probes labelled with ^{33}P or ^{35}S ; exposure to emulsion was for 8 days (^{33}P) or 6.5 days (^{35}S). Neuron counting was performed using a HISTOSCAN.S image analyser (Biocom, France). All TRH-positive cells and double-labelled cells were marked in the image analyzer and the resulting map and data stored. Data are mean \pm S.E.M. (number of independent determinations).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN
121

4. Discussion

Distributions of neurons containing either TRH, PC1 or PC2 overlap in the PVN. We observed that 60–70% of PVN TRH cells contain PC2 while only 37–46%, PC1 mRNA. These percentages were similar whether analyzed by ISH in consecutive sections or by double-label ISH, supporting the fact that these quantitative data may not be biased by methodological errors. However, we cannot completely exclude the possibility that a population of TRH neurons expressing either PC was not analyzed due to a specific loss during sectioning or to insufficient sensitivity of the hybridization procedure. For example, during double-label ISH, silver grains could be excluded from the cells by the chromagen used for non-isotopic detection, since it is electron dense. This seems nevertheless unlikely since analysis of TRH cells negative for either PC did not reveal more silver grains in the cell periphery or a different plane of focus than expected from background. Furthermore, we could determine that TRH cells between PVN and fornix express either PC mRNA with a higher frequency than in PVN, suggesting PVN data do not correspond to an upper limit of detection imposed by the methodology.

Endocrine cell lines expressing either PC1 or PC2 cleave pro-TRH [36]. Both enzymes efficiently cleave pro-TRH *in vitro* though their pH optima and kinetics differ [18,27]. Moreover, *in vitro* data might not reflect the exact pattern of cleavage *in vivo* given the concentration and steric conformation of the precursor in granules versus in solution as well as the role cofactors may play.

In a recent publication, Pu et al. [29] reported coexpression of pro-TRH with PC1 or PC2 mRNAs in several brain areas finding differential colocalization of either convertase mRNA with TRH mRNA; some PVN TRHergic neurons contained either PC1 or PC2 mRNA and neither PC mRNA was present in thalamic reticular nucleus. Our results confirm that the co-expression of PCs in TRH neurons is regionally differentiated: TRH cells between PVN and fornix express either PC mRNA with a higher frequency than in PVN.

Our quantitative results show that the sum of the percentages of PVN TRH cells containing either PC approaches 100%. This suggests that many cells do not express both PCs; instead, several phenotypes may be possible: some TRH neurons may have PC1 or PC2 mRNA while some both and others, a different one. A definitive knowledge of the extent of colocalization awaits further studies.

The number of PCs used to process a precursor varies with cell and precursor types. Transfection experiments have shown that pro-neuropeptide Y (pro-NPY) can be cleaved by cell lines expressing either PC1 or PC2 but pro-NPY is primarily processed by PC2 in superior cervical ganglia [28]. Studies in *Aplysia* have shown that processing of pro-egg laying hormone occurs through differ-

ent enzymes; one, present in the trans-Golgi network, is responsible for the first cleavage that leads to two molecular entities stored in different secretory granules and other PCs, inside the granules, that cleave the intermediates to the active peptides [11]. Pro-enkephalin processing shows a similar situation [22]. In addition, a particular PC could process another pro-protein present in the neuron and not the precursor under study: for example, in the PVN TRH neurons, brain derived neurotrophic factor (BDNF) may be processed by PC1 [25].

Biochemical heterogeneity in PVN parvocellular TRH neurons is thus supported by the differential coexpression of PC mRNAs as well as published findings as: the difference in cellular TRH mRNA concentration between anterior and medial-periventricular parts ([31], this study); the exclusive regulation of TRH mRNA in the medial-periventricular part [32]; some TRH neurons in PVN receive TRH synapses [38]; BDNF is expressed in response to stress in a subpopulation of these neurons [37]; only a small proportion express *c-fos* mRNA in response to cold stress [45].

What is the potential biochemical consequence of this heterogeneity? Neurons with variable proportions of PC1 and PC2 may generate alternative mixtures of TRH and cryptic or extended peptides as occurs for example in pro-TRH processing in the olfactory bulb where peptides distinct from those obtained in hypothalamus are probably due to the difference in PCs expression [29]. Differential regulation in processing efficiency could also occur between subsets of neurons. We have obtained preliminary evidence for regulation of PVN pro-TRH processing. Variations in the levels of median eminence TRH coincide with levels of PVN TRH mRNA in certain conditions as the circadian cycle [15], while in other circumstances, such as lactation, median eminence TRH concentration increases despite stable PVN TRH mRNA levels and no evidence for a decrease of TRH release [39]. This could imply regulation of the processing enzymes involved in converting pro-TRH to TRH. The alteration of the nature or efficiency of processing may in turn have subtle consequences in pituitary function since some TRH cryptic peptides alter adeno-hypophysial response to TRH [7,9].

Neuronal PC1 or PC2 mRNA levels can be modulated under various conditions [3,17]. In hippocampus, electrical stimulation causes a fast increase in PC1 mRNA with a slower response of PC2 mRNA [2]. In addition to mRNA level control, post-translational events may also differentially regulate PC's activity either at the trans-Golgi level, including the self-processing of PC2 regulated by 7B2 [4] or, inside the secretory granules. The varied environments may differentially alter the catalytic properties of the enzymes; changes in pH have been shown to regulate proinsulin processing [1,16] and intracellular pH can vary upon a stimulus. Other ions (calcium for example) could also modulate the enzymatic activity of any of the processing enzymes [19].

In conclusion, we suggest that more PVN parvocellular TRH neurons express PC2 mRNA than PC1 mRNA. A biochemical heterogeneity of the TRH biosynthetic machinery within PVN neurons may exist.

Acknowledgements

The technical assistance of M. Cisneros, X. Alvarado, E. Mata, M. Villa and A. Pichardo is recognized. We acknowledge the synthesis of oligonucleotides by P. Gaytan and E. Bustos and the computing support from R. Ciria, A. Ocadiz and A. Linares. This work was partially supported by grants from DGAPA-UNAM IN206094, CONACYT 4003344-5-4735N and MRC Canada PG11474.

References

- [1] R.G.W. Anderson, L. Orci, A view of acidic intracellular compartments, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 539–543.
- [2] R.V. Bhat, F.A. Tausk, J.M. Baraban, R.E. Mains, B.A. Eipper, Rapid increases in peptide processing enzyme expression in hippocampal neurons, *J. Neurochem.* 61 (1993) 1315–1322.
- [3] B.T. Bloomquist, B.A. Eipper, R.E. Mains, Prohormone converting enzymes: Regulation and evaluation of function using antisense-RNA, *Mol. Endocrinol.* 5 (1991) 2014–2024.
- [4] J.A.M. Braks, G.J.M. Martens, 7B2 is a neuroendocrine chaperone that transiently interacts with prohormone convertase PC2 in the secretory pathway, *Cell* 78 (1994) 263–273.
- [5] P.A. Bresnahan, R. Leduc, L. Thomas, J. Thormer, H.L. Gibson, A.J. Brake, P.J. Barr, G. Thomas, Human *fur* gene encodes a yeast KEX2-like endoprotease that cleaves pro- β -NGF in vivo, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 2851–2859.
- [6] M. Bulant, J.C. Beauvillain, A. Delfour, H. Vaudry, P. Nicolas, Processing of thyrotropin-releasing hormone (TRH) prohormone in the rat olfactory bulb generates novel TRH-related peptides, *Endocrinology* 127 (1990) 1978–1985.
- [7] M. Bulant, J.P. Roussel, H. Astier, P. Nicolas, H. Vaudry, Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone (pro-TRH) generates a biologically active peptide, prepro-TRH-(160–169), which regulates TRH-induced thyrotropin secretion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 4439–4443.
- [8] M. Bulant, A. Delfour, H. Vaudry, P. Nicolas, Processing of thyrotropin-releasing hormone prohormone generates pro-TRH connecting peptides, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17189–17196.
- [9] F.E. Carr, A.H. Reid, M.W. Wessendorf, A cryptic peptide from the preprothyrotropin-releasing hormone precursor stimulates thyrotropin gene expression, *Endocrinology* 133 (1993) 809–814.
- [10] S. Ceccatelli, M. Ericksson, T. Hökfelt, Distribution and coexistence of corticotropin-releasing factor-, neurotensin-, enkephalin-, cholecystokinin-, galanin- and vasoactive intestinal polypeptide/peptide histidine isoleucine-like peptides in the parvocellular part of the paraventricular nucleus, *Neuroendocrinology* 49 (1989) 309–323.
- [11] J.Y. Chun, J. Korner, T. Kreiner, R.H. Scheller, R. Axel, The function and differential sorting of a family of *Aplysia* prohormone processing enzymes, *Neuron* 12 (1994) 831–844.
- [12] S.M. Cockle, TRH-extended peptides in the olfactory lobe are formed by incomplete cleavage at pairs of arginine residues in the TRH prohormone, *FEBS Lett.* 264 (1990) 253–256.
- [13] S.M. Cockle, D.G. Smith, Specific processing of the thyrotropin-releasing prohormone in rat brain and spinal cord, *Eur. J. Biochem.* 165 (1987) 693–698.
- [14] G. Corkidi, Système d'analyse de préparations histologiques par imagerie numérique: HISTO 200. Application a l'étude physiopathologique de la maladie de Parkinson, Thèse de Doctorat, Université Paris Val de Marne, 1989.
- [15] L. Covarrubias, R.M. Uribe, M. Méndez, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Neuronal TRH synthesis: Developmental and circadian TRH mRNA levels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 151 (1988) 615–622.
- [16] H.W. Davidson, C.J. Rhodes, J.C. Hutton, Intraorganellar calcium and pH control proinsulin cleavage in the pancreatic β cell via two distinct site-specific endopeptidases, *Nature* 333 (1988) 93–96.
- [17] R. Day, M.K.-H. Schäfer, S.J. Watson, M. Chrétien, N.G. Seidah, Distribution and regulation of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the rat pituitary, *Mol. Endocrinol.* 6 (1992) 485–497.
- [18] T.C. Friedman, Y.P. Loh, N.X. Cawley, N.P. Birch, S.S. Huang, I.M.D. Jackson, E.A. Nillni, Processing of prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) by bovine intermediate lobe secretory vesicle membrane PC1 and PC2 enzymes, *Endocrinology* 136 (1995) 4462–4472.
- [19] R.S. Fuller, A. Brake, J. Thormer, Yeast prohormone processing enzyme (KEX2 gene product) is a Ca^{2+} -dependent serine protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1434–1438.
- [20] D.J. Hakes, N.P. Birch, A. Mezey, J.E. Dixon, Isolation of two complementary deoxyribonucleic acid clones from a rat insulinoma cell line based on similarities to Kex2 and furin sequences and the specific localization of each transcript to endocrine and neuroendocrine tissues in rats, *Endocrinology* 129 (1991) 3053–3060.
- [21] E.C. Hirsch, O. Lejeune, G. Colliot, G. Corkidi and M. Tajani, Computer methods in nuclei cartography, in: *Methods in Neurosciences*, vol. 10, Academic Press, New York, 1992, pp. 62–79.
- [22] K. Johanning, J.P. Mathis, I. Lindberg, Role of PC2 in proenkephalin processing: antisense and overexpression studies, *J. Neurochem.* 66 (1996) 898–907.
- [23] K.J. Koller, R.S. Wolff, M.K. Warden, R.T. Zoeller, Thyroid hormones regulate levels of thyrotropin-releasing hormone mRNA in the paraventricular nucleus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987) 7329–7333.
- [24] R.M. Lechan, P. Wu, I.M.D. Jackson, H. Wolf, S. Cooperman, G. Mandel, R.H. Goodman, Thyrotropin releasing hormone precursor: Characterization in rat brain, *Science* 231 (1986) 159–161.
- [25] M. Marcinkiewicz, T. Nagao, R. Day, N.G. Seidah, M. Chrétien, M. Avoli, Pilocarpine-induced seizures are accompanied by a transient elevation in the mRNA expression of the prohormone convertase PC1 in rat hippocampus: comparison with NGF and BDNF expression, *J. Neurosci.* 76 (1997) 425–439.
- [26] K. Mizuno, T. Nakamura, T. Ohshima, S. Tanaka, H. Matsuo, Yeast Kex2 gene encodes an endopeptidase homologous to subtilisin-like serine proteases, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 (1988) 246–254.
- [27] E.A. Nillni, T.C. Friedman, R.B. Todd, N.P. Birch, Y.P. Loh, I.M.D. Jackson, Pro-thyrotropin-releasing hormone processing by recombinant PC1, *J. Neurochem.* 65 (1995) 2462–2472.
- [28] L. Paquet, B. Massie, R.E. Mains, Proneuropeptide Y processing in large dense-core vesicles: Manipulation of prohormone convertase expression in sympathetic neurons using adenoviruses, *J. Neurosci.* 16 (1996) 964–973.
- [29] L.P. Pu, W. Ma, J.L. Barker, Y.P. Loh, Differential coexpression of genes encoding prothyrotropin-releasing hormone (Pro-TRH) and prohormone convertases (PC1 and PC2) in rat brain neurons: Implications for differential processing of pro-TRH, *Endocrinology* 137 (1996) 1233–1241.
- [30] M.K.-H. Schäfer, R. Day, W.E. Cullinan, M. Chrétien, N.G. Seidah, S.J. Watson, Gene expression of prohormone and proprotein convertases in the rat CNS: A comparative in situ hybridization analysis, *J. Neurosci.* 13 (1993) 1258–1279.

- [31] T.P. Segerson, H. Hoefler, H. Childers, H.J. Wolfe, P. Wu, I.M.D. Jackson, R.M. Lechan, Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain by *in situ* hybridization, *Endocrinology* 121 (1987) 98–107.
- [32] T.P. Segerson, J. Kauer, H.C. Wolfe, H. Mobtaker, P. Wu, I.M.D. Jackson, R.M. Lechan, Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus, *Science* 238 (1987) 78–80.
- [33] N.G. Seidah, M. Chrétien, R. Day, The family of subtilisin/kexin like proprotein and prohormone convertases: Divergent or shared functions, *Biochimie* 76 (1994) 197–209.
- [34] N.G. Seidah, L. Gaspar, P. Mion, M. Marcinkiewicz, M. Mbikay, M. Chrétien, cDNA sequence of two distinct pituitary proteins homologous to Kex2 and furin gene products: Tissue-specific mRNAs encoding candidates for prohormone processing proteinases, *DNA Cell Biol.* 9 (1990) 415–424.
- [35] N.G. Seidah, J. Hamelin, M. Mamarbachi, W. Dong, H. Tadros, M. Mbikay, M. Chrétien, R. Day, cDNA structure, tissue distribution and chromosomal localization of rat PC7, a novel mammalian proprotein convertase closest to yeast kexin-like proteinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 3388–3393.
- [36] K.A. Sevarino, R.H. Goodman, J. Spiess, I.M.D. Jackson, P. Wu, Thyrotropin-releasing hormone (TRH) precursor processing. Characterization of mature TRH and non-TRH peptides synthesized by transfected mammalian cells, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 21529–21535.
- [37] M.A. Smith, S. Makino, S.Y. Kim, R. Kvetnansky, Stress increases brain-derived neurotropic factor messenger ribonucleic acid in the hypothalamus and pituitary, *Endocrinology* 136 (1995) 3743–3750.
- [38] R. Toni, I.M.D. Jackson, R.M. Lechan, Thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive innervation of thyrotropin-releasing hormone-tuberoinfundibular neurons in rat hypothalamus: Anatomical basis to suggest ultrashort feedback regulation, *Neuroendocrinology* 52 (1990) 422–428.
- [39] R.M. Uribe, P. Joseph-Bravo, J. Pasten, G. Ponce, M. Méndez, L. Covarrubias, J.L. Charli, Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats, *Neuroendocrinology* 54 (1991) 493–498.
- [40] R.M. Uribe, J.L. Redondo, J.L. Charli, P. Joseph-Bravo, Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus, *Neuroendocrinology* 58 (1993) 140–145.
- [41] P. Wu, I.M.D. Jackson, Post-translational processing of thyrotropin-releasing hormone precursor in rat brain: Identification of 3 novel peptides derived from pro-TRH, *Brain Res.* 456 (1988) 22–28.
- [42] P. Wu, R.M. Lechan, I.M.D. Jackson, Identification and characterization of thyrotropin-releasing hormone precursor peptides in rat brain, *Endocrinology* 121 (1987) 108–115.
- [43] W.S. Young, III, Corticotropin-releasing factor mRNA in the hypothalamus is differently affected by drinking saline and by dehydration, *FEBS Lett.* 208 (1986) 158–162.
- [44] R.T. Zoeller, P.K. Rudeen, Ethanol blocks the cold-induced increase in thyrotropin-releasing hormone mRNA in paraventricular nuclei but not the cold-induced increase in thyrotropin, *Mol. Brain Res.* 13 (1992) 321–330.
- [45] R.T. Zoeller, A. Simonyi, O. Butnariu, D.L. Fletcher, P.K. Rudeen, S. McCrone, S.L. Petersen, Effect of acute ethanol administration and cold exposure on the hypothalamic–pituitary thyroid axis, *Endocrine* 3 (1995) 39–47.