



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA DEL DESARROLLO Y
FISIOLOGÍA MOLECULAR

*EL PAPEL DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE
BETA (TGF β) EN LA DIFERENCIACIÓN DEL FENOTIPO
TRHÉRGICO HIPOTALÁMICO*

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Miriam Martínez Armenta

DIRECTOR DE TESIS: DRA. LEONOR PÉREZ MARTÍNEZ



CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2008



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 fue realizado en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular bajo la dirección de la Dra. Leonor Perez Martínez con los apoyos de DGAPA-UNAM (IN227506-3) y CONACyT (61208).

Director de Tesis

Dra. Leonor Pérez Martínez

Comité Tutorial

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dra. Jean-Louis Charli Casalonga

Dr. Alfredo Varela Echavarria

Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia

Jurado de Exámen

Presiden Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay
te:

Secretar Dra. Leda Torres Maldonado
io

Vocal Dr. Julio Morán Andrade

Suplente Dra. Viviana Valadez Graham

Suplente Dra. Leonor Perez Martínez

IN MEMORIAM **LENON**

AGRADECIMIENTOS

A la excepcional mujer de ciencia: Leonor porque no sólo has sido una excelente tutora, sino un ejemplo a seguir en todos los aspectos

A Jean-Louis Charli y Patricia Joseph por contribuir de manera tan importante en mi crecimiento académico dentro de su grupo de trabajo

A Josefina, Alejandra, Enrique, Juan Carlos, Vero y la pequeña Carlita: porque tu familia nunca te abandona

A Rocío porque me has estado conmigo en los buenos y malos momentos y has convertido nuestra casita en un verdadero hogar

A Ana porque contigo estoy aprendiendo a conocerme y ha crecer como persona, sin ti nunca hubiera podido concluir

ABREVIATURAS

ARN	núcleo arcuato
ATF3	factor activador de la transcripción 3
AVP	arginina-vasopresina
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
CRH	hormona estimulante de corticotropina
DA	Dopamina
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
GABA	ácido γ -aminobutírico
GHRH	hormona estimulante de la hormona de crecimiento
GnRH	hormona liberadora de gonadotropinas
ISH	hibridación <i>in situ</i>
KLF	factor similar a kruppel
LHA	área lateral hipotalámica
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MZ	zona del manto
NPY	neuropéptido Y
OT	Oxitocina
POA	área preóptica
POMC	pro-opiomelanocortina
PON	núcleo preóptico
PV	núcleo periventricular
PVN	núcleo paraventricular
RNA	ácido ribonucleico
SBE	elemento de unión para proteínas Smad
Shh	sonic hedgehog
siRNA	ácido ribonucleico interferente pequeño
SNC	sistema nervioso central
SON	núcleo supraóptico
SS	Somatostatina
SVZ	zona subventricular
T β R	receptor del factor de crecimiento transformante β
TGF β	factor de crecimiento transformante β
TIEG	gen inducido tempranamente por TGF β
TRH	hormona estimulante de tirotrópina
TrkB	receptor de la familia tirosina cinasa tipo B
VMN	núcleo ventromedial
VZ	zona ventricular
ZLI	zona limitante intratálámica

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática del hipotálamo	14
Figura 2. Vía de señalización clásica de TGF β	21
Figura 3. Clasificación de los factores similares a kruppel humanos	25
Figura 4. Estructura de la proteína TIEG1	25
Figura 5. Papel de TIEG1 en la regulación de la vía de señalización TGF β -Smad	27
Figura 6. Expresión de TIEG1 durante el desarrollo del SNC	28
Figura 7. Elementos de unión para factores tipo KLF en la región promotora de TRH	29
Figura 8. Patrón de expresión del mRNA de las isoformas TGF β 1, 2 y 3 durante el desarrollo en el hipotálamo de rata	42
Figura 9. Patrón de expresión del mRNA de los receptores T β -RI y T β -RII durante el desarrollo en el hipotálamo de rata	44
Figura 10. Patrón de expresión de las proteínas Smad 2/3 durante el desarrollo hipotalámico	45
Figura 11. Patrón de expresión del mRNA de TIEG1 durante la ontogenia del hipotálamo de rata	46

Figura 12. Patrón de expresión de la proteína TIEG1 durante el desarrollo Hipotalámico	46
Figura 13. Cinética de expresión de TIEG1 bajo el efecto de TGF β en cultivo primario hipotalámico	48
Figura 14. Cinética de la expresión del mRNA TRH en respuesta al estímulo con TGF β en cultivos primarios hipotalámicos	49
Figura 15. Cinética de CRH bajo el efecto de TGF β en cultivo primario Hipotalámico	50
Figura 16. Determinación de los niveles del mRNA de TRH en respuesta a la sobre-expresión de TIEG1 en las células CA-77	51
Figura 17. Regulación de la actividad del promotor de TRH por el factor de transcripción TIEG1. Células hipotalámicas	53
Figura 18. Regulación de la actividad del promotor de TRH por TIEG1 y TGF β	54
Figura 19. Interacción <i>in vivo</i> del TIEG1 con el promotor de TRH	55
Figura 20. Caracterización del cultivo de explante	57
Figura 21. Modelo hipotético para la regulación de gen de TRH durante el desarrollo	65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Generación de neuronas parvocelulares en hipotálamo de rata	18
Tabla 2. Secuencias de oligonucleotidos diseñadas a partir del banco de genes para los blancos respectivos y condiciones para RT-PCR	35
Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados para en análisis de inmuno- precipitación de cromatina mediante PCR semicuantitativa	34

RESÚMEN

El hipotálamo juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos, controlando la síntesis y liberación de múltiples hormonas a partir de la hipófisis. Sin embargo, a pesar de su importancia fisiológica, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que participan durante el establecimiento y/o mantenimiento de los diferentes fenotipos neuronales hipotalámicos. Con el fin de caracterizar dichos mecanismos y tomando como modelo a las neuronas que expresan la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en nuestro grupo se analizó mediante microarreglos de DNA el transcriptoma de células TRHérgicas purificadas mediante citometría de flujo. En este análisis se encontró modificada la expresión de 21 transcritos, destacando el incremento observado en la expresión del gen inducido tempranamente por TGF-beta (TIEG1) cuyo papel durante el desarrollo del sistema nervioso no ha sido descrito previamente. Asimismo, estudios recientes demostraron que TGF-beta promueve la diferenciación neuronal induciendo la salida del ciclo celular de progenitores neurales. El propósito de este trabajo fue demostrar que TGF-beta promueve la diferenciación del fenotipo TRHérgico a través de regular la expresión de TIEG1. Para esto determinamos mediante RT-PCR semicuantitativa, la expresión de las isoformas y receptores de TGF-beta, así como de las proteínas Smad2/3, durante el desarrollo hipotalámico, encontrando que dicho patrón coincide con la etapa de establecimiento-diferenciación terminal del fenotipo. De igual forma demostramos que en cultivos primarios de hipotálamo fetal de 17 días de gestación, el tratamiento con TGF-beta 2 incrementa los niveles de expresión del mRNA de TRH, además de regular la tasa de transcripción del promotor mínimo de TRH. Finalmente, observamos que en nuestro sistema el TGF-beta 2 regula la expresión de mRNA de TIEG1, el cual no sólo transactiva al gen de TRH sino que es capaz de unirse in vivo al promotor de TRH. Estos datos sugieren que el TGF-beta probablemente a través de la acción de TIEG1 regula la expresión del gen de TRH hipotalámico durante la etapa de diferenciación terminal.

ABSTRACT

Hypothalamic neurons play a key role in homeostasis by regulating hormone secretion from the hypophysis. Despite huge knowledge about physiological function of this neuro-hormone, little is known about the molecular pathways regulating their expression during development. Accordingly, our group has been interested in the characterization of the molecular mechanisms that regulate thyrotropin-releasing hormone (TRH) phenotype. Recently, we have analyzed the TRH expressing cells transcriptome by using DNA microarrays. Among the 21 transcripts regulated, the TGFbeta early inducible gene-1 (TIEG1) transcription factor resulted increased. So far, the role of TIEG1 during central nervous system development is unknown. Recently, it has been demonstrated that TGFbeta exerts anti-proliferative effects on neural progenitor cells in primary cultures from adult hippocampus. Therefore, the present work was aimed to test the hypothesis that TGF β promotes hypothalamic TRH phenotype differentiation by regulating TIEG1 gene expression.

As a first approach, TGFbeta isoforms and receptors mRNA levels were measured during *in vivo* development by semi-quantitative RT-PCR. We also analyzed the expression of Smad2/3 proteins. The results show that these mRNA and proteins were detected from embryonic day 14 to adulthood. Interestingly, their expression pattern coincides with the birthdate of hypothalamic TRH expressing neurons. On the other hand, we analyzed the effect of this cytokine in primary cultures derived from E17 rat hypothalamus. Under these conditions, TGFbeta-2 increases TRH mRNA expression *in vitro* by regulating TRH promoter activity. Finally, we showed that TGFbeta-2 regulates TIEG1 mRNA expression. In addition, TIEG1 overexpression up-regulates transcriptional activity of TRH promoter and is able to bind *in vivo* to specific DNA elements (GC-rich box or CACCC) present on the rat TRH promoter. Altogether, these results suggest that TGFbeta-2 regulates TRH gene expression during development through the action of the transcription factor, TIEG1.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tablas

1.	Introducción	
1.1	Origen del hipotálamo	14
1.2	Inducción y modelamiento hipotalámico	15
1.3	Especificación celular del hipotálamo	16
1.4	Diferenciación neural hipotalámica	17
2.	Antecedentes	
2.1	El factor de crecimiento transformante beta (TGF β) en el SNC	20
2.2	El gen inducido tempranamente por TGF β -1 (TIEG1)	24
2.3	Regulación en la expresión de TIEG1 durante el desarrollo	28
2.4	Análisis de la región promotora del gen de TRH	28
3.	Hipótesis	30
4.	Objetivos	30
5.	Materiales y métodos	
5.1	Muestreo de hipotálamos	31
5.2	Cultivo primario hipotalámico	31
5.3	Cultivo de células CA77	32
5.4	Extracción de RNA	32
5.5	Estandarización de las condiciones de RT-PCR	33
5.6	Semicuantificación de mRNA mediante RT-PCR	35
5.7	Transfección y ensayo de luciferasa	36
5.8	Western blot	36
5.9	Transfección siRNA-TIEG1	37
5.10	Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)	38
5.11	Estandarización del cultivo de explante	39
5.12	Análisis estadístico	40

6.	Resultados	
6.1	Expresión del mRNA de TGF β , los receptores T β RI, T β RII, las proteínas Smad2/3 y TIEG1 durante el desarrollo hipotalámico de rata	41
6.2	Efecto del TGF β en cultivos primarios de hipotálamo fetal	47
6.3	Efecto de TIEG1 sobre la expresión del mRNA de TRH	50
6.4	Regulación de la actividad transcripcional de TRH <i>in vitro</i>	51
6.5	Silenciamiento de TIEG1 mediante siRNA	53
6.6	Interacción del promotor de TH con el factor de transcripción TIEG1 <i>in vivo</i>	54
6.7	Cultivo de explante de cerebro de rata	56
7.	Discusión	
7.1	TGF β y la diferenciación del fenotipo TRHérgico	58
7.2	Posibles mecanismos de acción de TGF β para regular la expresión del mRNA de TRH	60
7.3	Modelo de acción propuesto para la diferenciación del fenotipo TRHérgico	64
8.	Conclusiones	66
9.	Perspectivas	67
10.	Referencias	68

1. INTRODUCCIÓN

El hipotálamo es el regulador maestro tanto de las funciones del Sistema Nervioso Autónomo como del Sistema Neuroendócrino. A pesar de ser una estructura altamente conservada a lo largo de la evolución en el cerebro de los vertebrados (Figura 1) y de que muchas poblaciones neuronales en el adulto se encuentran bien caracterizadas, poco se sabe del mecanismo que regula la neurogénesis en esta región del cerebro durante el desarrollo (Lee et al., 2006).

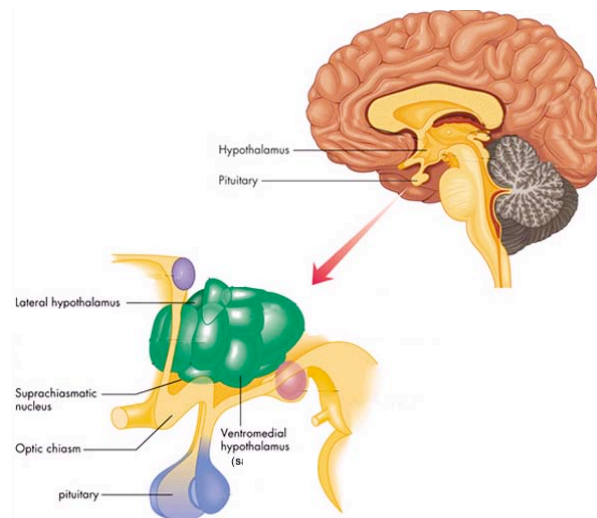


Figura 1. Representación esquemática del hipotálamo. En la parte superior se muestra la ubicación del hipotálamo dentro del cerebro, así como su conexión con la glándula hipófisis. Abajo una ampliación del hipotálamo en donde se muestran algunos de los núcleos que los constituyen (Tomado de Abizaid et al., 2006)

1.1 ORIGEN DEL HIPOTÁLAMO

El prosencéfalo o cerebro anterior, es posiblemente el sistema biológico más complejo, ya que comprende estructuras altamente heterogéneas que se derivan de la zona anterior del tubo neural. Tan pronto como este se ha cerrado, el prosencéfalo primario se divide en dos componentes: el diencéfalo caudal y el prosencéfalo secundario. El prosencéfalo secundario forma el diencéfalo rostral –futuro hipotálamo–, mientras que el resto originará por evaginación las vesículas telencefálicas y ópticas (Kandel et al., 2000).

Al igual que en otras regiones del tubo neural, el prosencéfalo embrionario parece estar organizado en secciones transversales y longitudinales. Evidencia experimental ha demostrado que las subdivisiones transversales del prosencéfalo generan dominios llamados prosómeros, los cuales son más evidentes en la zona caudal del diencefalo, constituido por los prosómeros 1-3 (p1-p3), mientras que el diencefalo rostral está formado por los prosómeros 4-6 (p4-p6) (Kiecker y Lumsden, 2005).

El prosencéfalo puede también ser subdividido en dominios longitudinales, denominados en dirección ventro-dorsal como: placa del piso, placa basal, placa alar y placa del techo. Al igual que en las regiones más caudales del tubo neural, las placas del piso y del techo constituyen respectivamente, la línea media ventral y dorsal. Por otro lado, la placa basal forma el tegmentum prerubral en el diencefalo caudal (p1-p3), mientras que rostralmente, ésta origina el hipotálamo en sentido estricto (p4-p6) (Marín y Rubenstein, 2002).

1.2 INDUCCIÓN Y MODELAMIENTO HIPOTÁLAMICO

En las etapas tardías del desarrollo de la placa neural, se ha demostrado que existen dominios de expresión para ciertos genes (Marín y Rubenstein, 2002), por ejemplo, el diencefalo se distingue del telencefalo por la falta de expresión del gen BFI (Foxg1). En contraste, el diencefalo rostral a la zona limitante intratálmica (ZLI) se caracteriza por la expresión de BF2 (Marín y Rubenstein, 2002).

El diencefalo ventral está constituido por la placa alar y la placa basal, siendo esta última la que originará el hipotálamo. La evidencia sugiere que los constituyentes celulares de la placa basal son inducidos y modelados mediante señales originadas en el mesodermo axial (Marín y Rubenstein, 2002). Una de las moléculas candidatas es Sonic Hedgehog (Shh), ya que el ratón nulo para su expresión carece de hipotálamo y la sobre-expresión del mismo lleva a la expresión ectópica de marcadores hipotalámicos en el pez cebra (revisado en Mathieu J et al., 2002). En el ratón, las señales transducidas por Shh tienen como blanco genes homeobox como *nkx*, de los cuales al menos seis son expresados en el diencefalo ventral: *nkx 2.1*, *nkx 2.2*, *nkx 2.4*, *nkx 5.1*, *nkx 5.2* y *nkx 6.1* aunque únicamente el ratón *nkx 2.1^{-/-}* revela defectos

morfológicos y en el modelamiento temprano hipotalámico (Marín y Rubenstein, 2002).

Por otro lado, el factor de crecimiento fibroblástico-8 (Fgf-8) puede participar en colaboración con Shh en la modelación del hipotálamo tuberal (Marín y Rubenstein, 2002).

1.3 ESPECIFICACIÓN CELULAR DEL HIPOTÁLAMO

Los procesos que controlan la especificación y crecimiento diferencial del cerebro, actúan sobre células progenitoras neuroepiteliales que residen en el epitelio pseudoestratificado –epitelio germinal- que rodea el espacio ventricular. Conforme avanza el desarrollo, este epitelio forma las zonas ventricular (VZ) y del manto (MZ). Las células progenitoras salen del ciclo celular dentro de la VZ y migran hacia la zona de diferenciación (MZ) ubicada debajo de la superficie pial. Sin embargo, algunas células que han salido de la VZ permanecen mitóticamente activas y entran a una segunda zona proliferativa (la zona subventricular SVZ) ubicada entre la VZ y la MZ. En el caso particular del hipotálamo, éste tiene su origen a partir del epitelio germinal del tercer ventrículo (Figdor y Stern, 1993).

La generación de neuronas y células gliales a partir de los precursores del neuroepitelio involucra una serie de pasos para generar tipos celulares más restringidos. Estos pasos incluyen 1) especificación del tipo celular, 2) salida del ciclo celular c) diferenciación de sus propiedades celulares, 4) migración hacia su localización final y, 5) producción de los contactos célula-célula adecuados (vg sinapsis) a través de la elaboración de procesos dendríticos y axonales (Marín y Rubenstein, 2002).

Los primeros pasos hacia la especificación de ciertos fenotipos podrían estar controlados por procesos más generales como la especificación regional. Por ejemplo, se sabe que el establecimiento del eje dorso-ventral produce columnas longitudinales de progenitores neuronales con propiedades moleculares distintas a diferentes niveles sobre este eje. De manera similar, ciertas subpoblaciones de neuronas telencefálicas con distintos fenotipos, se derivan de progenitores localizados en diferentes regiones. Así, mientras las células glutamatérgicas son generalmente producidas en el área del

pallium, la mayoría de las células que expresan GABA se generan en el subpallium. Sin embargo es posible que algunos aspectos de la especificación del prosencéfalo y en particular del hipotálamo puedan ser reguladas de manera independiente a la especificación regional y después del estadio de progenitor neural. Por ejemplo, que la identidad celular pueda ser modulada después de que una célula postmitótica haya migrado desde su sitio de origen hasta su ubicación final, la cual contiene señales de diferenciación específica, tal y como sucede con las células ganglionares de la retina (Marín y Rubenstein, 2002).

1.4 DIFERENCIACIÓN NEURAL HIPOTALÁMICA

El hipotálamo neuroendócrino consiste fundamentalmente de dos poblaciones distintas de neuronas: las magnocelulares agrupadas en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) que proyectan sus axones a la hipófisis posterior para liberar oxitocina (OT) y arginina vasopresina (AVP); y las parvocelulares distribuidas en los núcleos preóptico (PON), periventricular (PV), arcuato (ARN), ventromedial (VMN) y PVN de donde proyectan sus terminales a la eminencia media de donde liberan la hormona estimulante de tirotrópina (TRH), hormona estimulante de corticotropina (CRH), somatostatina (SS), hormona estimulante de la hormona de crecimiento (GHRH), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y dopamina (DA) (Zigmong et al., 1999).

Gracias al uso de timidina [^3H] y bromodeoxiuridina (BrdU), se ha podido establecer *in vivo* el "nacimiento" de poblaciones neuronales específicas. En la rata, los cinco fenotipos neuroendócrinos parvocelulares, con excepción de GnRH, son generados a partir del tercer ventrículo con periodos de formación parcialmente sobrelapados entre los días E11-E17, aunque sus picos de nacimiento pueden diferir, tal como se puede observar en la Tabla 1 (Markakis y Swanson, 1997).

Asimismo, los análisis efectuados por hibridación *in situ* (ISH) e inmunohistoquímica, han permitido detectar al mRNA y/o al péptido característico para cada uno de los fenotipos. Para el caso de TRH, en la rata, el mRNA se detecta por ISH desde el día E14 en el área lateral hipotalámica (LHA), y hasta el día E16 en el PVN, expresión que va en aumento hasta el día siete de la vida post-natal, en donde

comienza a ser regulado negativamente por hormonas tiroideas (Segerson et al., 1987). De manera similar, estudios con anticuerpos contra CRH, han detectado la señal inmunorreactiva en células de E15 en el LHA y al E16 en el PVN (Revisado en Markakis, 2002).

Péptido	Neuronas neuroendócrinas		Neuronas no neuroendócrinas	
	Ventana de nacimiento	Pico máximo de nacimiento	Ventana de nacimiento	Pico máximo de nacimiento
<i>TRH</i>	E12-E14	E13	E11-E15	E12
<i>CRH</i>	E12-E14	E13	E12-E14	E13
<i>GHRH</i>	E11-E15	E13	E12-E16	E14
<i>SS</i>	E12-E15	E13	E11-E17	E15
<i>DA</i>	E11-E15	E12	E11-E16	- -

Tabla 1. Generación de neuronas parvocelulares en hipotálamo de rata (Tomado de Markakis y Swanson, 1997)

Una vez que una célula se ha comprometido a abandonar el ciclo celular y ha sido especificada para una clase de neurona en particular, un proceso progresivo de diferenciación guiará a dicha célula hacia su fenotipo maduro. La neurogénesis del hipotálamo neuroendócrino requiere la acción combinada de varios factores de transcripción, cuya función se ha podido identificar gracias a estudios realizados tanto a nivel genético como molecular. En el caso del ratón “knock-out” para el gen de la familia homeobox *otp* el PVN, SON, PV anterior y ARN muestran una baja densidad celular, además de que la expresión de TRH, CRH, AVP, OT y SS se encuentra totalmente abatida (Acampora et al., 1999; Wang y Lufkin, 2000).

Otro factor de transcripción involucrado en el desarrollo de las neuronas del PVN y SON es *brn2* perteneciente a la familia de factores con dominio POU; el ratón nulo para la expresión de *brn2* exhibe defectos en la expresión de CRH, OT y AVP de dichos núcleos, sin embargo, los niveles de TRH y SS se mantienen normales (Schonemann et al., 1995).

Finalmente el análisis de los ratones mutantes *sim1^{-/-}* y *arnt2^{-/-}* ha demostrado hipocelularidad tanto en el PVN como en el SON, dando como resultado la ausencia

en la expresión de OT, AVP, TRH, CRH y SS (Michaud et al., 1998; Michaud et al., 2000).

Estos estudios en conjunto demuestran la importancia de dichos factores de transcripción al regular la diferenciación de ciertos fenotipos neurales en regiones específicas dentro del cerebro. Sin embargo, a pesar de esto y del amplio conocimiento que existe sobre la función de los fenotipos neuroendócrinos existe un gran abismo en nuestro conocimiento sobre los mecanismos moleculares existentes entre la especificación del hipotálamo y la adquisición de un fenotipo particular.

2. ANTECEDENTES

En el grupo, uno de nuestros objetivos ha sido caracterizar los mecanismos moleculares que regulan el establecimiento y/o mantenimiento del fenotipo TRHérgico hipotalámico. En este sentido hemos demostrado que en la rata, la neurotrofina BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro) regula *in vitro* los niveles de expresión del mRNA de TRH en etapas embrionarias (E17) y que dicho efecto es a través de su receptor específico TrkB presente en una subpoblación de células TRHérgicas (Guerra-Crespo et al., 2001). Sin embargo, hasta el momento desconocemos si los efectos mediados por BDNF son directos sobre la tasa de transcripción del gen o indirectos, involucrando la activación o inhibición de otros genes.

En seguimiento a este estudio, recientemente, analizamos el transcriptoma de neuronas TRHérgicas a través de microarreglos de DNA (GenChip U34A, Affymetrix). Los datos obtenidos a partir de los microarreglos muestran que 21 transcritos tienen niveles de expresión aumentados o disminuídos significativamente respecto al control de células hipotalámicas no purificadas (Guerra-Crespo, 2004).

De especial interés para nosotros resultó el incremento observado en la expresión de tres factores de transcripción: el factor activador de la transcripción 3 (ATF3), el factor 4 similar a krüppel (KLF4) y el gen inducido tempranamente por TGF β (TIEG1 o KLF10), todos ellos involucrados en procesos de diferenciación en diferentes tipos celulares (Segre et al., 1999; Subramaniam et al., 1995a; Kang et al., 2003). Interesantemente, estos tres factores de transcripción comparten la peculiaridad de ser regulados por TGF β (King et al., 2003; Hefferan et al., 2000a; Kang et al., 2003), además de que su papel durante el desarrollo del sistema nervioso y en particular del hipotálamo es aún desconocido.

2.1 EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA (TGF β) EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La familia de TGF β esta representada por tres isoformas, provenientes de genes diferentes y expresadas tanto en células gliales como en neuronas: TGF β 1, que se expresa principalmente en el plexo coroideo y meninges (Unsicker et al., 1991) y

TGF β 2 y β 3 con un patrón de distribución más general: prosencefalo, glia radial y cuerpos neuronales de corteza y cerebelo (Flanders et al., 1991) y mesencéfalo (Poulsen et al., 1994) durante la etapa embrionaria, así como neuronas piramidales del hipocampo, giro dentado, capas II, III y V de la corteza cerebral, células de Purkinje (Unsicker et al., 1991) e hipotálamo en etapa adulta (Bouret et al., 2004).

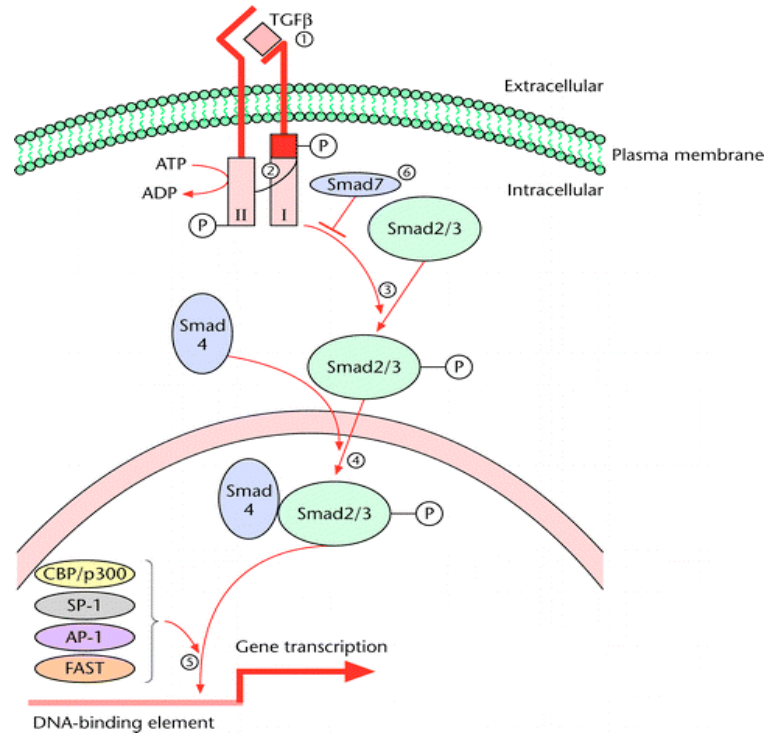


Figura 2. Vía de señalización clásica de TGF β . La cascada de señalización inicia con la unión del TGF β a sus receptores (I y II), los cuales activan a las proteínas Smad 2/3. Estas a su vez forman complejo con la Smad4 para trasladarse al núcleo en donde finalmente regulan la expresión de sus genes blanco tras la asociación con moléculas co-activadoras o co-represoras (Tomado de Serra, 2002).

Los miembros de esta familia se unen a tres tipos de receptores denominados T β RI, T β RII y T β RIII, los cuales son específicos para el TGF β y no para otros miembros de la superfamilia. El receptor T β RIII, betaglicano o endogлина, no participa directamente en el proceso de señalización, aunque si es capaz de modular el acceso del ligando al receptor. Los receptores T β RI y T β RII responsables de la transducción de señales son proteínas transmembranales tipo serina/treonina cinasas. La unión de TGF β al T β RII induce el reclutamiento del T β RI formando un complejo tetramérico. El siguiente paso es la fosforilación en los residuos de serina ubicados en las cajas GS del T β RI por el T β RII, el cual una vez activo, fosforila residuos de serina en las

proteínas R-Smad (Smad 2 y 3). La fosforilación de R-Smad induce su unión a la proteína Co-Smad4. El complejo trimérico R-Smad/Co-Smad-4 se transloca al núcleo donde regula sus genes blanco a través de la unión a los elementos de respuesta (SBE: *Smad binding element*) presentes en la región promotora de dichos genes. El proceso culmina con la conjugación de Smad2 con la ubiquitina y el envío del complejo al proteosoma para su degradación. Asimismo, existe una regulación negativa, a través de los Smads inhibitorios (I-Smads), como Smad 6 y 7. El Smad7 es capaz de unirse al T β RI evitando que fosforile a los Smads 2 y Smad 3, además de reclutar en el mismo receptor, proteínas que ligan ubiquitina como Smurf1 y Smurf2 (Revisado en Böttner et al., 2000) (Figura 2).

La habilidad de las Smads para activar o reprimir la actividad transcripcional de sus genes blanco, depende de la interacción del dominio de activación (MH2) con cofactores que afectan la estructura de la cromatina o bien, por la interacción con el aparato de transcripción basal. Por ejemplo, la acetil-transferasa de histonas CBP/p300 relaja la estructura del nucleosoma al interactuar con las proteínas R-Smads o Co-Smad, facilitando así el inicio de la transcripción. De manera contraria, Smad2 interactúa con el cofactor TGIF (*TG sequence interacting factor*), el cual recluta a la desacetilasa de histonas 1 (HDAC1) reprimiendo así la transcripción en células COS 1 (Wotton et al., 1999).

Respecto a sus funciones dentro del sistema nervioso, recientemente se encontró que en cultivos primarios de prosencéfalo de ratón, el mRNA de Smad 2 se expresa desde etapas embrionarias tempranas (E14), post-natales (P1 y P8) y disminuye en el adulto; inversamente el mRNA de Smad 3 es indetectable al día E14 y aumenta de manera considerable al día E17 manteniéndose estable hasta la etapa adulta; mientras que Smad 4 se expresa constantemente en las diferentes etapas del desarrollo del SNC analizadas (Lopez-Coviella et al., 2006).

En el adulto, la expresión del mRNA de TGF β 1, los receptores T β RI y T β RII y los R-Smad 2 y 3 ocurre en zonas del área preóptica (POA) y del hipotálamo mediobasal (PV anteroventral, área preóptica medial, ARN y eminencia media) (Bouret et al., 2004). Sin embargo, el patrón de expresión de estas moléculas durante el desarrollo del hipotálamo aún no se ha determinado.

Es importante recalcar que los T β Rs pueden ejercer su efecto no sólo a través

de proteínas Smad, sino utilizar vías alternas. Por ejemplo, se ha demostrado que tras la activación de TGF β , el T β RI recluta y fosforila de manera directa a la proteína adaptadora ShcA en residuos de serina y de tirosina. Esta fosforilación induce a su vez la asociación de ShcA con Grb2 y Sos activando así la vía de Erk-MAPK (Lee et al., 2007). Asimismo, al tratar de dilucidar el mecanismo molecular que controla la disolución de las uniones estrechas, un evento temprano involucrado en la transición epitelio-mesenquima, el grupo de Wrana observó que el T β RII fosforila directamente a Par6, el cual interactúa directamente con la ligasa de ubiquitina Smurf1. Esta interacción permite a Smurf1 la degradación de RhoA cuyo efecto último es la pérdida de uniones estrechas (Ozdamar et al., 2005).

Respecto a las funciones de la familia de los TGF β s durante el desarrollo neuronal, durante los últimos años se ha estudiado ampliamente el papel del TGF β sobre el fenotipo dopaminérgico. El grupo de Poulsen ha observado que TGF β 2 y TGF β 3 promueven de manera importante la sobrevivencia de neuronas dopaminérgicas de rata en cultivos de mesencéfalo (E14) (Poulsen et al., 1994). Otros estudios sugieren que el TGF β por sí sólo no es un factor neurotrófico, sino que actúa en concierto con otras moléculas como FGF2, FGF8 y el factor neurotrófico derivado de la glia (GDNF) induciendo la sobrevivencia neuronal (Krieglstein et al., 1998; Roussa et al., 2004). Recientemente, el grupo de Krieglstein reportó que el TGF β induce la especificación neuronal y sobrevivencia de neuronas TH+ en el cerebro medio, actuando de manera sinérgica con Shh (Farkas et al., 2003).

Otros estudios reportan que las tres isoformas inducen de igual manera la expresión de marcadores serotoninérgicos en cultivos de romboencéfalo de rata (E12-E14) (Galter et al., 1999). Por otro lado, los patrones de expresión de TGF β 2 y β 3, sugieren un papel importante en la regulación de la migración neuronal y diferenciación tanto en la corteza telencefálica como en el cerebelo (Flanders et al., 1991).

Aunque el papel de TGF β durante la neurogénesis no se ha estudiado directamente, un estudio reciente en el que se analizó el transcriptoma de células troncales diferenciadas a fenotipos neuronales, muestra que la expresión de las isoformas TGF β 2 y β 3, los receptores T β RI, II y III, así como del factor Smad 3, se

encuentran significativamente incrementados desde el estadio 3 (progenitores neurales) hasta el estadio 5 (neuronas diferenciadas) (Ahn et al., 2004). Dado que la salida del ciclo celular es una condición indispensable para el proceso de diferenciación, estos datos apuntan a que TGF β pudiese participar en la regulación del ciclo celular de progenitores neurales.

En este sentido, el grupo de Almeida identificó -al utilizar medio condicionado de cerebelo de adulto-, que la interacción de TGF β y BDNF regula la salida del ciclo celular de progenitores neurales hipocampales de cerebro adulto (Lu et al., 2005).

Si bien estudios previos indican que TGF β 1 regula negativamente la expresión de los genes pro-opiomelanocortina (POMC) (Bouret et al., 2001) y GnRH (Bouret et al., 2004) en el cerebro adulto, su papel durante el desarrollo de los fenotipos neuroendócrinos hipotalámicos aún no se ha determinado, por lo que resulta sumamente prometedor el estudio de TGF β y particularmente su gen blanco más obvio: el gen inducido tempranamente por TGF β durante el desarrollo.

2.2 EL GEN INDUCIDO TEMPRANAMENTE POR TGF β (TIEG-1 O KLF10)

El factor TIEG1 pertenece a la familia de los factores de transcripción similares a krüppel (KLFs) filogenéticamente relacionada con la familia de los factores de transcripción SP1 (Figura 3), y que de manera general se caracterizan por la presencia de tres dedos de zinc tipo C2H2 en el extremo carboxilo terminal, a través de los cuales interactúan con el DNA; además poseen gran homología con el gen de segmentación krüppel de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (Dang et al., 2000).

El gen de TIEG1 -8kb- esta formado por cinco exones, sin embargo, el análisis informático no muestra la presencia de una caja TATA o secuencia de iniciación en su extremo 5', aunque si existen secuencias consenso para factores de transcripción como Sp1 o JunB. Como se muestra en la Figura 4, TIEG1 posee además del dominio de unión a DNA, tres dominios de represión (R1-R3), un dominio SH3 importante para su interacción con proteínas que poseen dominios ricos en prolinas así como un dominio de unión para la ligasa de ubiquitina SIAH -*Seven In Absentia Homologue-1-*

(Subramaniam et al., 2007).

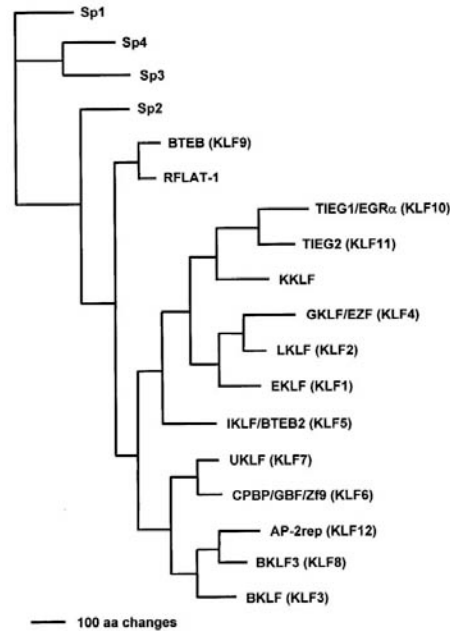


Figura 3. Clasificación de los factores similares a kruppel humanos. TIEG1 (KLF10) y las proteínas relacionadas fueron identificadas mediante el BLAST y alineadas mediante el programa PileUp. La línea horizontal de la izquierda representa cambios en 100 aminoácidos. (Tomado de Dang et al., 2000)

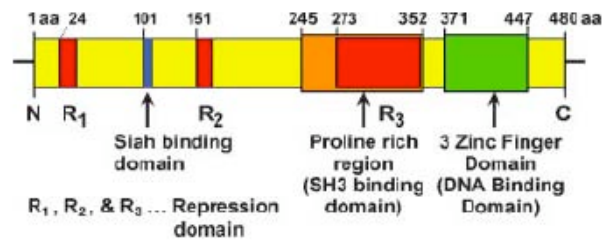


Figura 4. Estructura de la proteína TIEG1. Diagrama donde se representan los principales dominios presentes en la proteína de TIEG1. La caja verde representa el dominio de unión al DNA, mientras que las tres cajas en rojo representan los tres dominios de represión. También se esquematizan el dominio Siah (azul) y la región rica en prolinas (naranja) (Tomado de Subramaniam et al., 2007)

Descrito originalmente en el humano como un gen de inducción temprana en respuesta a TGF β , el transcrito de TIEG1 codifica para una proteína de 480 aminoácidos (72 kDa) cuya expresión es rápidamente inducida -30 minutos- en osteoblastos de humano tratados con TGF β , alcanzando un máximo de aproximadamente diez veces respecto al control 120 minutos post-tratamiento (Subramaniam et al., 1995a). Además del efecto inductor de las tres isoformas de TGF β se ha observado que otros miembros de la superfamilia como BMP-2 y BMP-4

(Hefferan et al., 2000b) así como el factor de crecimiento epidermal -EGF- (Subramaniam et al., 1995a) y los estrógenos (Tau et al., 1998), pero no otras citocinas (PDGF, IGFs, FGF, TNF- α , IL-6, y IL-1 β) (Subramaniam et al., 1995a) regulan tanto los niveles de expresión del mRNA de TIEG1 como los de proteína. Asimismo, se ha observado mediante microscopia confocal que en osteoblastos de humano la proteína se localiza principalmente en el citoplasma de células no tratadas, y que los niveles de TIEG1 en el núcleo se incrementan tras el tratamiento con TGF β . Por otra parte, el análisis de queratinocitos de humano no tratados revela que TIEG1 se localiza fundamentalmente en el citoplasma y que el tratamiento con H₂O₂ induce su traslocación hacia el núcleo (Subramaniam et al., 1998).

TIEG1 es capaz de regular la tasa de transcripción positivamente (Noti et al., 2004) o negativamente (Johnsen et al., 2002b) al unirse a secuencias tipo 5'-CACCC-3' o cajas GC 5'-GGGCGGG-3' o 5'-GGTGTG-3' presentes en la región promotora de sus genes blanco (Ou et al., 2004; Chrisman y Tindall, 2003). La capacidad represora de TIEG se atribuye a la interacción de TIEG1 con mSin3A, el cual media la represión de sus genes blanco (Zhang et al., 2001).

Respecto al papel que TIEG1 juega en la vía de señalización de TGF β , estudios realizados con células MG-63 -osteosarcoma humano- y PANC1 -carcinoma pancreático- demuestran que la sobre-expresión de TIEG1 mimetiza los efectos de TGF β (Tachibana et al., 1997; Cook y Urrutia, 2000) los cuales son Smad dependientes, ya que en ausencia de Smad4 o en presencia de Smad7 la sobre-expresión de TIEG1 no tiene ningún efecto (Johnsen et al., 2002a).

Como se esquematiza en la Figura 5, se ha demostrado que los efectos de TIEG1 sobre la vía de TGF β se pueden dar a tres niveles: 1) incrementando la inducción de genes endógenos regulados por TGF β como p21 (inhibidor de CDKs) y PAI-1 (involucrado en angiogénesis); 2) incrementando la tasa de transcripción y la fosforilación de Smad2 o bien 3) reprimiendo la expresión del gen inhibitorio Smad7 (Johnsen et al., 2002a y 2002b).

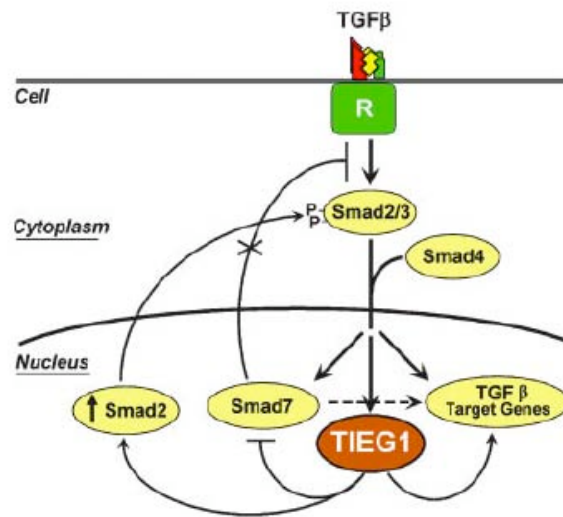


Figura 5. Papel de TIEG1 en la regulación de la vía de señalización TGF β -Smad. Los principales efectos mediados por la sobre-expresión de TIEG1 en diferentes sistemas se representan en este esquema: 1) aumento en la actividad transcripcional y fosforilación de Smad2; 2) inhibición de la proteína inhibitoria Smad7; 3) inducción de genes blanco de la vía TGF β (Tomado de Subramaniam et al., 2007)

Estudios diversos indican que TIEG1 participa en la regulación de diferentes procesos celulares sumamente importantes durante el desarrollo como la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Hefferan et al., 2000b; Tachibana et al., 1997), además se ha observado una correlación inversa entre los niveles de expresión de TIEG1 y la severidad de ciertos tipos de cáncer (revisado en Subramaniam et al. 2007).

Para dilucidar el papel que este factor de transcripción pudiese jugar durante el desarrollo, recientemente se generó el ratón mutante *tieg1*^{-/-}, el cual muestra un aumento en el número de osteoblastos pero sin contribuir a la formación nueva de hueso, así como una disminución en el número de osteocitos, lo cual se atribuye a problemas en la diferenciación de osteoblastos, y que de manera interesante se observa exclusivamente en hembras (Subramaniam et al., 2005); mientras que los machos, muestran problemas de hipertrofia cardiaca la cual incluye un incremento en el tamaño de los ventrículos, en el peso y grosor de las paredes cardiacas e hipertrofia septal (Rajamannan et al., 2007). Sin embargo, datos sobre el fenotipo del sistema nervioso no fueron reportados en estos estudio, por lo que una vez más resulta interesante el papel de este factor de transcripción durante el desarrollo del SNC.

En este sentido, datos preliminares en nuestro laboratorio indican que la expresión de TIEG1 es regulada durante el desarrollo del hipotálamo de rata. Ensayos de RT-PCR muestran que el mRNA de TIEG1 es detectable desde el día E14, con picos de expresión a los días E15, E19 y alcanzando un máximo al día del nacimiento (P0) disminuyendo en la etapa adulta (Figura 6). Asimismo, se observó que en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata (E17) el tratamiento con TGF β -2 incrementa la expresión del mRNA de TRH (Datos no mostrados).

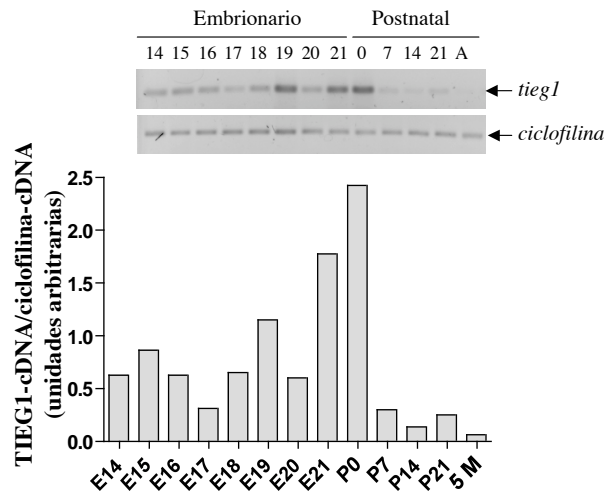


Figura 6. Expresión de TIEG1 durante el desarrollo del SNC. Los niveles del mRNA de TIEG1 se determinaron por RT-PCR a partir de RNA total de hipotálamo de rata. Como control interno se determinaron los niveles del mRNA de cicofilina. (E) etapa embrionario, (P) post-natal y (5m) adulto (Pérez-Martínez, datos no publicados).

2.3 ANÁLISIS DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN DE TRH

El análisis informático de la región promotora del gen de TRH de la rata con ayuda del programa MATINSPECTOR de GENOMATIX (Cartharius et al., 2005) ha permitido identificar cuatro posibles sitios de unión para los factores del tipo KLF: dos cajas tipo CACCC y dos cajas GC (Figura 7). El hecho de que además dichos sitios se conserven en ratón y humano, nos lleva a pensar que los KLFs pudiesen efectivamente jugar un papel importante en la expresión del gen de TRH.

En base a que i) se ha reportado que TGF β promueve la diferenciación neuronal dentro del SNC induciendo la salida del ciclo celular de progenitores neurales; ii) la expresión del mRNA de TIEG1 coincide con el nacimiento de neuronas TRHérgicas hipotalámicas; iii) a que los niveles de expresión de TIEG1 se

encontraron incrementados al analizar el transcriptoma de células TRHérgicas hipotalámicas en etapas embrionarias; y iv) a la presencia de elementos de unión para proteínas del tipo Klf, proponemos a TIEG1 como un posible regulador en el establecimiento del fenotipo TRHérgico hipotalámico.

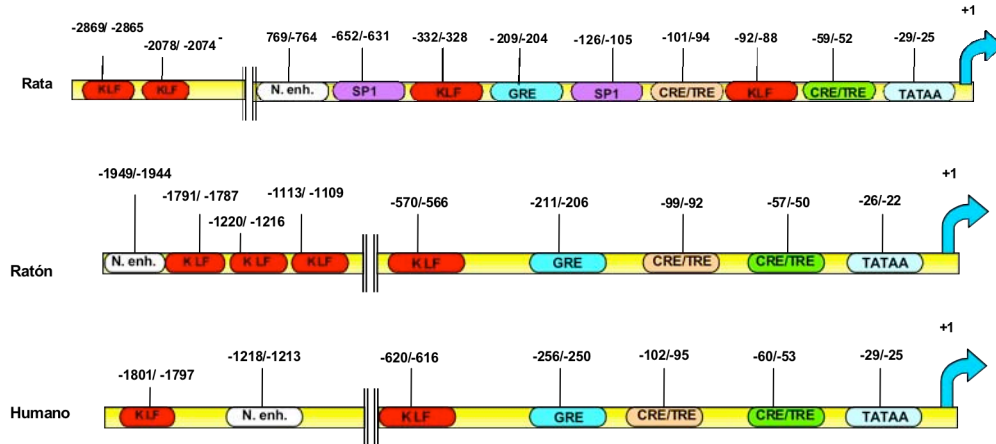


Figura 7. Elementos de unión para factores tipo KLF en la región promotora de TRH. Esquema que representa los elementos de respuesta a distintos factores de transcripción presentes en la región regulatoria del gen de TRH de rata, ratón y humano. Los sitios posibles de reconocimiento para elementos tipo KLF están representados en rojo, mientras que los elementos con cajas tipo GC están representados en morado. Se representan también las secuencias consenso CRE, elemento de respuesta a cAMP, TRE elemento de respuesta a hormona tiroidea y GRE, elemento de respuesta a glucocorticoides; así como la caja TATA y el N. Enh., “enhancer neuronal”.

3. HIPÓTESIS

TGF β a través de TIEG1, promueve la diferenciación de neuronas hipotalámicas TRHérgicas durante el desarrollo.

4. OBJETIVOS

GENERAL

Demostrar que TGF β induce la expresión del gen de TRH durante la diferenciación terminal de este fenotipo hipotalámico.

ESPECÍFICOS

1. Demostrar que TGF β regula la expresión del mRNA del gen de TRH.

Para lo cual:

- 1.1 Se analizará la ontogenia de las diferentes isoformas de TGF- β y de sus receptores *in vivo* e *in vitro*.
- 1.2 Se determinará si TGF- β regula la expresión del mRNA de TRH en cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17).
- 1.3 Se evaluará si TGF β regula la actividad transcripcional del gen de TRH *in vitro*.

2. Demostrar que TGF β a través de TIEG1 regula la diferenciación del fenotipo TRHérgico hipotalámico en etapas tempranas del desarrollo.

Para ello se determinará si:

- 2.1 La expresión de TIEG1 se regula en respuesta a TGF β durante el desarrollo hipotalámico.
- 2.2 TIEG1 regula *in vitro* la expresión del mRNA de TRH.
- 2.3 TIEG1 se une al promotor del gen de TRH *in vivo* durante el desarrollo embrionario.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MUESTREO DE HIPOTÁLAMOS

Para todos los experimentos se emplearon ratas de la cepa *Wistar* mantenidas en el bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM. Los procedimientos utilizados fueron evaluados y aprobados por el Comité de Bioética del mismo Instituto. Para el estudio ontogénico durante el desarrollo del hipotálamo de rata, utilizamos tejidos desde el día embrionario 14 (E14) hasta E21, los días post-natales (P) 0, 7, 14 y 21, así como en adulto (5 meses de edad). Las ratas gestantes y animales post-natales, se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12 hr/12 hr), temperatura (17°C) y alimentadas *ad libitum* hasta el momento de su decapitación alrededor de las 12:00 hrs. Las hembras gestantes se anestesiaron con pentobarbital (40 µl/250 g peso Sedalphorte) y los embriones fueron extraídos uno a uno. Bajo el microscopio estereoscópico, se realizó un corte a través de la línea imaginaria que une el borde superior del ojo y el oído, disecando el hipotálamo, región comprendida por detrás del quiasma óptico, entre los surcos laterales y por delante de los cuerpos mamilares a una profundidad aproximada de 3 mm. Los hipotálamos fueron congelados en hielo seco y almacenados a -70°C hasta su uso (Joseph-Bravo et al., 2002).

5.2 CULTIVO PRIMARIO HIPOTALÁMICO

Los cultivos se realizaron empleando hipotálamos de embriones de rata de 17 días de gestación los cuales fueron disectados como se describió previamente. Los hipotálamos fueron colectados en solución Hank's, lavados, cortados e incubados durante 15 minutos con una mezcla de DNAsa tipo I (0.28 mg/ml) y Tripsina tipo III (0.26 mg/ml). La reacción se detuvo con suero fetal bovino (FBS) y DNAsa tipo I (0.28 mg/ml) dispersando posteriormente de manera mecánica con pipetas Pasteur de diferentes diámetros. La suspensión celular fue centrifugada a 1500 rpm (Centrifuga 5403, Eppendorf) por 4 min a temperatura ambiente y resuspendida en 5 ml de medio DMEM (Gibco-BRL) suplementado con 10% FBS (Terracell International), 0,5 mM de glutamina y 1% de una mezcla de antibiótico-antimicótico. La densidad celular se determinó en un hemocitometro, obteniendo un rendimiento promedio de 1.0×10^6

células/hipotálamo. La viabilidad (~98%) fue determinada mediante tinción por exclusión con azul tripano. Cajas de cultivo con pozos de 15 mm previamente cubiertas con poli-D-lisina (1.5 µg/ml) fueron sembradas con $1.5-2.0 \times 10^5$ células en un volumen final de 0.5 ml de medio neurobasal (NB) suplementado con B27 (Gibco-BRL), 0,5 mM glutamina, 1% antibiótico-antimicótico y 3×10^9 M 17β -estradiol, en presencia o ausencia de las diferentes isoformas de TGF- β , a una concentración de 2.5 ng/ml. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C con 7% CO₂, 95% de humedad y cosechados en los tiempos requeridos. Para el análisis de los niveles basales de expresión del mRNA, las células se sembraron en medio DMEM suplementado con 10% FBS.

5.3 CULTIVO DE CÉLULAS CA77

La línea CA77 (carcinoma de tiroides) fue crecida en un medio compuesto DMEM/F10 (Gibco-BRL) en una relación 1:1 (vol/vol) suplementado con 10% FBS y 1% de antibiótico-antimicótico. Las células ($0,5 \times 10^4$ /cm²) fueron sub-cultivadas cada semana y el medio cambiado después de 4 DIV. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora REVCO a 37°C con 5% CO₂ y 95% de humedad. La transfección se realizó como se describe posteriormente y cosechados en los tiempos requeridos.

5.4 EXTRACCIÓN DE RNA

El RNA total fue extraído a partir de células en cultivo, tejido o explantes congelados por el método de isotiocianato de guanidina (Chomczynski y Sacchi, 1987), el cual consistió en homogenizar las muestras en 400 µl de solución D (4 M tiocianato de guanidina, 25 mM citrato de sodio pH 7.0, 0.5% sarcosil, 0.1 M β -mercaptoetanol), 40 µl acetato de sodio 2 M (NaOAc) y mezclar en vortex vigorosamente. Posteriormente se añadieron 400 µl de fenol saturado con agua agitando de la misma forma. A la mezcla anterior se le agregaron 100 µl de cloroformo:isoamil-alcohol (49:1), centrifugando los tubos a 4°C y 13,000 rpm (Microcentrifuga 5415, Eppendorf) durante 17 minutos. El sobrenadante se mezcló con 450 µl de isopropanol y se incubó durante 30 minutos en hielo seco, posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm/4°C durante 22 minutos. Se desechó el

sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 300 µl de solución D y 300 µl de isopropanol, incubando toda la noche a -20°C.

Al día siguiente las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm/4°C durante 22 minutos. Posteriormente la pastilla se lavó con 400 µl de etanol al 70% centrifugando bajo las mismas condiciones. Finalmente, el sobrenadante se desechó dejando secar el botón a temperatura ambiente durante 5 a 10 minutos. El RNA se resuspendió en agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC 0,1%).

Para la cuantificación del RNA total de las muestras se tomó una alícuota (2 µl RNA + 98 µl H₂O) para medir la densidad óptica con luz ultravioleta a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf). Sólo se utilizaron aquellas muestras cuya relación 260/280 fuera mayor a 1.5. La concentración del RNA se calculó mediante la fórmula:

$$\frac{(\text{densidad óptica}) (\text{factor de dilución}) (40)}{1000} = \mu\text{g}/\mu\text{l}$$

La calidad del RNA se verificó por electroforesis en gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio (EthBr). Las bandas correspondientes a las subunidades 28S y 18S debían guardar una proporción 2:1 y no mostrar barridos que indicasen degradación.

5.5 ESTANDARIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RT-PCR.

Las condiciones óptimas para la determinación de los niveles de expresión de un mRNA mediante RT-PCR consisten básicamente en: (1) obtener oligonucleótidos con una secuencia que corresponda sólo al cDNA para el cual se diseñaron; (2) conocer la cinética de la reacción para seleccionar un ciclo en que el producto de PCR se encuentre en la fase logarítmica, de forma que las mediciones reflejen fielmente la cantidad del mRNA y; (3) seleccionar la temperatura de hibridación adecuada, para amplificar de manera específica el mRNA de interés (Ambion, 2006).

Con base en la secuencia del mRNA de TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, TβRI, TβRII, TIEG1, nestina, enolasa y β-tubulina se diseñaron pares de oligonucleótidos específicos (Tabla 2) para cada transcrito utilizando el programa PRIMER 3 (Rozen y Skaletsky, 2000). Posteriormente, para verificar la ausencia de estructuras secundarias

y la formación de dímeros entre los oligonucleótidos se utilizó el programa Oligo 4 (National Biosciences, Plymouth, MN, USA), mientras que la especificidad de cada par fue verificada mediante el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search) del NCBI (Altschul et al., 1997).

La estandarización de las condiciones de PCR se realizó utilizando hipotálamos de embriones de rata de 18 días de gestación (E18). Las condiciones de transcripción reversa fueron las que previamente se estandarizaron en el laboratorio (Pérez-Martínez et al., 1998). Brevemente, consistió en adicionar 1 µg de RNA total a un volumen final de reacción de 32 µl que contenían por cada tubo 8.9 µl de agua bidestilada estéril tratada con DEPC, 6 µl de buffer RT 5X (250 mM Tris-HCl pH 8.4, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 3 µl de dithiothreitol (DTT) 0.1 M, 0.6 µl de deoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 1 µl de oligodeoxinucleótido de timidina (oligo dT) 0.5 µg/µl y 0.5 µl de transcriptasa reversa M-MLV (200 U/µl; Invitrogen). El RNA fue preincubado durante 5 minutos a 65°C antes de la síntesis del cDNA y transferido inmediatamente a hielo. La reacción de transcripción reversa se realizó durante 2 hrs a 37°C. Las muestras fueron mantenidas a 4°C para realizar la PCR inmediatamente o almacenadas a -20°C hasta su uso. Para la optimización de la PCR se utilizó un volumen fijo del templado (6 µl cDNA). Éste se amplificó por diferentes ciclos (20-30) junto con un gradiente de temperatura (55-65°C) utilizando un termociclador (Mastercycler de Eppendorf).

Se tomaron alícuotas de 10 µl de los productos de PCR para someterlos a electroforesis a través de geles de agarosa 2% durante 90 minutos a 110 volts, los cuales fueron posteriormente teñidos con EthBr. Los geles fueron iluminados con una lámpara de luz ultravioleta (UV), fotografiados y cuantificados mediante densitometría asistida por computadora (Fluor-S Multimager) según el protocolo previamente descrito (Pérez-Martínez et al., 2001). La migración de los productos de PCR fue comparada con una escalera de DNA en el rango de 100-1200 pares de bases (pb) (NEBiolabs).

Después del análisis, determinamos que bajo nuestras condiciones de reacción, las condiciones de temperatura y número de ciclos enlistadas en la tabla 2 son adecuadas para amplificar los transcritos correspondientes.

		Secuencia oligonucleotidos (5' → 3')	Tamaño (pb)	T hibridación (°C)	No. Ciclos
TGFβ1	Up	ATA CGC CTG AGT GGC TGT CT	153	64	30
	Dwn	TGG GAC TGA TCC CAT TGA TT			
TGFβ2	Up	GGA AAT CAA AAT CAA AGG AGT GG	287	56	28
	Dwn	AGT TGG CAT AGT AAC CCT TAG G			
TGFβ3	Dwn	TGC AGG AGC AAA AAG GTT CT	287	56	28
	Dwn	GTC AGA GGC TCC AGG TCT TG			
TβRI	Up	TTT GAG GAG GGC AGC TTT TA	204	60	32
	Dwn	ACC AGT GAG GAG ACC CAA TG			
TβRII	Up	TCA CTA GGC ACG TCA TCA GC	195	64	30
	Dwn	AGG ACA ACC CGA AGT CAC AC			
TIEG1	Up	CCG GAG AAG AAC CCA CAT AA	155	56	28
	Dwn	GAG GAA GGC ACA GCA AAG TC			
TRH	Up	GAC AGC TAG TGA AGG GAA CAG G	300	64	30
	Dwn	CCC TGG ATG GAG TCT GAT GT			
CRH	Up	GCT AAC TTT TTC CGC GTG TT	175	60	27 y 30
	Dwn	GGT GGA AGG TGA GAT CCA GA			
TH	Up	TCC TGC ACT CCC TGT CAG AG	175	60	27 y 30
	Dwn	CCA AGA GCA GCC CT CAA AGG			
Nestina	Up	AAC CAC AGG AGT GGG AAC TG	219	58	27
	Dwn	TCT GGC ATT GAC TGA GCA AC			
β-Tubulina III	Up	TGC GTG TGT ACA GGT GAA TGC	240	62	29
	Dwn	AGG CTG CAT AGT CAT TTC CAA G			
Enolasa	Up	ATG CTG GAG TTG GAT GGG ACT GAG	477	63	28
	Dwn	GTA AAA CTC AGA GGC AGC CAC ATC			
G3PDH	Up	TGA AGG TCG GTG TCA ACG GAT TTG	984	64	24
	Dwn	CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC			
Ciclofilina	Up	GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA	259	64	24
	Dwn	ACA TGC TTG CCA TCC AGC C			

Tabla 2. Secuencias de oligonucleotidos diseñadas a partir del banco de genes para los blancos respectivos y condiciones para RT-PCR.

5.6 SEMICUANTIFICACIÓN DE mRNA MEDIANTE RT-PCR

Los cambios relativos en los niveles del mRNA de TRH, TIEG1, TGF-β1, TGFβ2, TGFβ3, TβRI, TβRII, CRH, Nestina, Enolasa y β-tubulina III se determinaron por PCR semicuantitativa, utilizando el mRNA de ciclofilina o G3PDH como controles internos. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 50 µl conteniendo: 6 µl del producto de RT (4 µl para el caso de los controles endógenos), 5 µl de buffer para Taq DNA polimerasa 10X (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 500 mM KCl, gelatina 10 µg/ml), 2.5 µl de MgCl₂ 30 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de los oligonucleótidos -sentido y antisentido- correspondientes para los genes de interés (25 pmol/µl) y ciclofilina/G3PDH (50 pmol/µl), 0.5 µl de Taq DNA polimerasa (Amplificasa 5 U/µl; Biogénica) y agua para llevar al volumen final de 50 µl.

5.7 TRANSFECCIÓN Y ENSAYO DE LUCIFERASA EN CULTIVO PRIMARIO

Cultivos primarios hipotalámicos mantenidos durante 24 hrs en cajas de cultivo con pozos de 15 mm y sembradas a una densidad celular de 2.0×10^5 fueron transfectados de manera transitoria utilizando polietilenimina (Guerra-Crespo et al., 2003). Para las transfecciones se utilizaron 800 ng del vector de expresión pNASS-rTRH-Luc (TRH-Luc) el cual contiene la región promotora del gen de TRH de rata (-776/+85) unido al gen reportero de luciferasa (Balkan et al., 1998) y 80 ng de pCH110 (β -galactosidasa) (donado por la Dra. Susana Castro; IBT-UNAM) utilizado como control interno de eficiencia de transfección. Las co-transfecciones se realizaron con 800 ng del vector de expresión pcDNA4/TO-Flag-TIEG para el factor de transcripción TIEG1 (Donado por el Dr. Malayan Subramaniam, Clinica Mayo), junto con el 800 ng del plásmido reportero TRH-Luc, 80 ng de β -gal u 800 ng de PUC18 (Fermentas) para un total de 1.68 μ g de DNA plasmídico por pozo.

Protocolo A: Después de 3 horas, la mezcla de transfección fue sustituida por 0.5 ml de DMEM suplementado con 10% FBS (GIBCO) o NB suplementado con B27 (GIBCO) para ser cosechadas 4 días después.

Protocolo B: Tras 3 horas de transfección los cultivos se mantuvieron durante 72 horas en presencia de DMEM suplementado con 10% FBS (GIBCO) para posteriormente ser tratadas durante 24 horas con 2.5 ng/ml de TGF β en NB-B27.

Transcurrido el tiempo, las células fueron cosechadas con 30 μ l de buffer de lisis (Applied Biosystems), siguiendo las especificaciones del fabricante para determinar la actividad enzimática de luciferasa en el luminómetro Monolight 2020 (Analytical Luminiscence Laboratory). Los valores de luciferasa fueron normalizados respecto a los valores obtenidos para β -galactosidasa y contenido de proteína. Los datos se expresaron como actividad relativa de luciferasa.

5.8 WESTERN BLOT

Se prepararon extractos totales de proteína a partir de hipotálamos de diferentes edades, tal y como se describió previamente (Pérez-Martínez y Jaworski, 2005), utilizando buffer de lisis (0.5 mM PMSF, 20 mM Hepes (pH 7.4), 0.4 M NaCl,

1 mM EDTA, 1 mM EGTA) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Roche Applied Science) e incubando 15 min a 4°C. Posteriormente, los extractos se centrifugaron a 10000 x g por 30 min a 4°C. Se recuperaron los sobrenadantes y se cuantificaron a 594 nm utilizando el ensayo de Bradford. Los extractos se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Cantidades iguales de proteína (30 µg) se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) al 12% y se transfirieron a membranas de PVDF (Milipore) durante 2 hrs a TA utilizando buffer de transferencia pH 8.3 (39mM glicina, 48mM TRIS base, 0,037% SDS, 20% metanol). Las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en Tris buffer salino con 0.1% de Tween-20 (TBST). Los anticuerpos anti-Smad2/3 (1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-TIEG1 (3µg/ml), anti-Flag (1:1500, Stratagene) y anti-actina (1:1000, Santa Cruz Biotechnology) se incubaron en 3% de BSA en TBST toda la noche en agitación a 4°C. Posteriormente las membranas se lavaron 3 veces en TBST durante 10 minutos y se incubaron durante 2 hrs a TA con el anticuerpo secundario correspondiente acoplado a peroxidasa (1:3000, Santa Cruz Biotechnology) utilizando leche al 5% en TBST. Finalmente las membranas se lavaron 3 veces durante 10 minutos con TBST, se revelaron con el reactivo quimioluminiscente Luminol (Perkin Elmer) y se expusieron a películas radiográficas Kodak.

5.9 TRANSFECCIÓN DEL siRNA PARA TIEG1 EN CULTIVOS PRIMARIOS

El siRNATIEG1 diseñado por Dharmacon tiene la secuencia GCAAACAACUCUCUCGUUAUU (sentido) UAACGAGAGAGUUGUUUGCUU (antisentido) correspondiente a los nucleótidos 887 a 908 del gen de TIEG1 de rata (número de acceso: NM_031135). La transfección se realizó con el kit Nucleofector para células neurales primarias (Amaxa) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Una vez dissociado el tejido (ver arriba cultivo primario), para cada transfección se utilizaron 5.0×10^6 células, las cuales fueron centrifugadas a 1200 rpm (Microcentrifuga 5415, Eppendorf) durante 5 minutos y tras la adición del siRNA, resuspendidas en 100 µl de solución de nucleofección. Las células fueron

electroporadas y resuspendidas en 400 μ l DMEM-Advanced (GIBCO) y sembradas a la densidad apropiada. La eficiencia de transfección se determinó con el vector pmaxGFP (Amaxa) y analizada por citometría de flujo (FACSsort, Becton Dickinson).

5.10 ENSAYO DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP)

El ensayo de inmunoprecipitación de cromatina se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito (De la Rosa-Velázquez et al., 2007) con algunas modificaciones. Preparamos células -2×10^7 a partir de hipotálamos fetales (E17) tal y como se describió para el cultivo primario. Tras fijar las células durante 10 min a TA con 1% de formaldehído, se añadió 1.25 M de glicina para detener la reacción de entrecruzamiento agitando suavemente y centrifugando 5 min a 1200 rpm/4°C (Centrifuga 5403, Eppendorf) y lavando dos veces con PBS 1X frío. Las células se resuspendieron en 1 ml de buffer de lisis (1% SDS, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8,1) conteniendo inhibidores de proteasas (Complete, Roche Applied Science) y se incubaron 10 min en hielo. Las muestras se sonicaron en un ultrasonicador (Cole Parmer) durante 20 segundos con una amplitud de 35% para obtener fragmentos de cromatina entre 300 y 600 pb. Los lisados se centrifugaron a 4°C por 10 min a 13000 rpm. Se recuperó el sobrenadante asegurando de tomar una alícuota a la que se refiere como INPUT. Con el fin de disminuir las uniones inespecíficas entre el anticuerpo y la cromatina, ésta se diluyó 1:10 en buffer de dilución (1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 150 mM NaCl) y se incubó 3 hrs a 4°C con 20 μ l de esferas de agarosa acopladas a proteína A/G. Transcurrido ese tiempo las muestras se centrifugaron a 4°C por 5 min a 3000 rpm y se recuperó el sobrenadante en alícuotas de 1 ml. A cada alícuota se le añadieron 4 μ g de los anticuerpos anti-TIEG1 o IgG como anticuerpo irrelevante y se incubaron toda a noche a 4°C con agitación constante.

Al día siguiente se añadieron 20 μ l de proteína A/G-agarosa incubando 4 horas en agitación a 4°C. Se recuperó la fracción inmunoprecipitada mediante centrifugación y se realizaron lavados secuenciales con los buffers paro I (0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 150 mM NaCl) paro II (0,1% SDS, 1% Tritón X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 8,1, 500 mM NaCl), paro III (0,25

M LiCl, 1% NP-40, 1% Deoxicolato, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,1) y dos veces con buffer TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0).

Las muestras se incubaron con 500 µl de RNAsa A y proteinasa K durante 30 min a 37°C y posteriormente a 65°C durante toda la noche. Al día siguiente, el DNA se purificó con un kit de QIAGEN siguiendo las instrucciones del fabricante, para posteriormente analizarlo mediante PCR semicuantitativa. Para esto, se diseñaron a partir del promotor de TRH, tres juegos de oligonucleótidos denominados P1, P2 y P3 cuyas secuencias se muestran en la tabla 3, donde además se indican las regiones que flanquean, los elementos presentes en dichas regiones y los productos de PCR esperados.

Oligonucleótido		Secuencia (5' → 3')	Región flanqueada	Elementos de unión presentes	Producto PCR
P1	<i>Up</i> <i>Dwn</i>	ACG TCT CTC CCT CCC TTT GT AGG GGG GGG TGA GGC TTA T	-125/-20	GC y CACCC	232 pb
P2	<i>Up</i> <i>Dwn</i>	TCA CAG GTC CCC ATT TTT GT GAG TAG TCC GCG ATG GAA AG	-586/-257	CACCC	330 pb
P3	<i>Up</i> <i>Dwn</i>	CGT TTT CCA CAG AAG CCA GT ACA AAA ATG GGG ACC TGT GA	-767/-566	GC	201 pb

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados para en análisis de inmunoprecipitación de cromatina mediante PCR semecuantitativa.

5.11 ESTANDARIZACIÓN DEL CULTIVO DE EXPLANTE

El cultivo de explante se realizó de acuerdo a lo reportado previamente (Echavarría D. et al. 2000). Los embriones de 12 días de gestación se extrajeron al igual que para cultivo primario, colectandolos en PBS 1X. Las cabezas se cortaron a nivel del primer rombomero, para posteriormente disectarlos a lo largo de la línea media dorsal simulando un libro abierto. El explante se transfirió -con la cara ventricular hacia abajo- a una membrana de policarbonato de 0,45 µm (Millipore) para colocarlo en flotación en una caja de cultivo de 35 mm con DMEM suplementado más 10% FBS. Los explantes se mantuvieron durante 48 o 72 horas a 37°C, con 7% CO₂ y 95% de humedad. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

5.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos representan la media \pm EE (error estándar) de por lo menos tres experimentos independientes. El análisis estadístico para comparaciones múltiples se realizó mediante ANOVA utilizando la prueba *post-hoc* de Bonferroni o bien utilizando la prueba de *t* de Student. Se tomaron como significativos valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 EXPRESIÓN DE TGF β 1, 2 Y 3, LOS RECEPTORES T β RI, T β RII, LAS PROTEÍNAS SMAD2/3 Y TIEG1 DURANTE EL DESARROLLO HIPOTALÁMICO DE RATA.

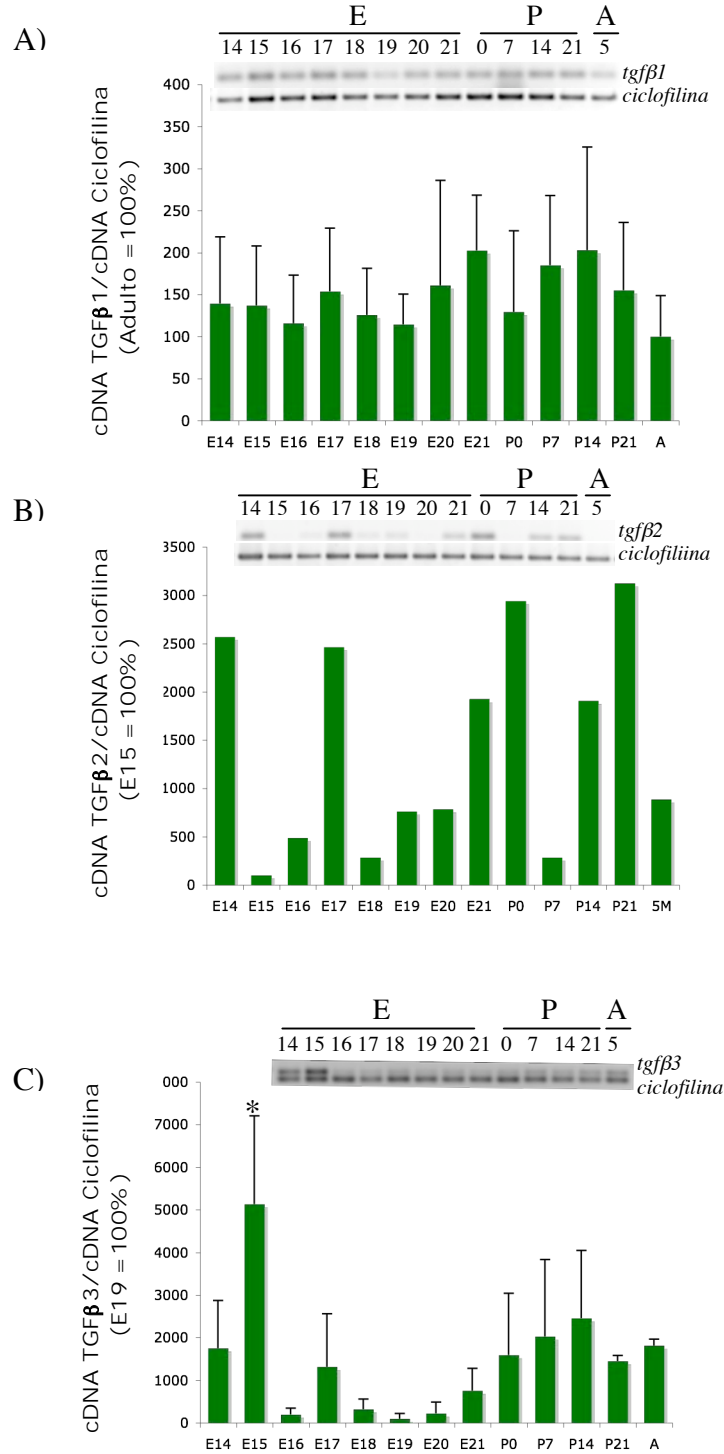
Para determinar si una molécula tiene un efecto o no sobre un fenotipo específico durante el desarrollo, el primer paso consiste en determinar si dicha molécula es producida o se expresan en el micro-ambiente en que se localiza la población neuronal de interés. En este estudio, como primer acercamiento analizamos mediante RT-PCR semicuantitativa, los niveles de expresión del mRNA para las tres isoformas de TGF β y los receptores T β RI y II durante el desarrollo en hipotálamo de rata, a partir del día embrionario (E) 14 y hasta el día E21, en la etapa post-natal (P) a los días 0, 7, 14 y 21, y en la edad adulta (A) representada por machos de cinco meses de edad y utilizando como control interno al gen de ciclofilina, cuyos niveles de expresión no varían a lo largo del desarrollo (Botte et al., 1998).

Nuestros resultados revelan que TGF β 1 se expresa, con niveles bajos respecto a las isoformas TGF β 2 y TGF β 3, en el hipotálamo de rata desde etapas muy tempranas (E14) y hasta la etapa adulta, además de que dichos niveles son relativamente constantes a lo largo del desarrollo (Figura 8A). La posible relevancia de este patrón de expresión se discutirá más adelante.

El mismo tipo de análisis en por lo menos dos ensayos independientes, muestra un patrón de expresión más dinámico para las isoformas TGF β 2 y β 3. Como podemos observar en la Figura 8B el mRNA de TGF β 2 muestra niveles detectables desde el inicio y a lo largo del desarrollo hipotalámico, sin embargo destacan los bajos niveles de expresión observados a los días E15, E18 y P7.

De igual forma, el análisis del mRNA de TGF β 3 (Figura 8C) presenta niveles detectables en el hipotálamo de rata a lo largo del desarrollo. Sin embargo, destacan los niveles de expresión tan bajos observados para esta isoforma en la etapa embrionaria tardía y cuyo patrón tiende a revertirse justo antes del nacimiento para mantenerse relativamente constante en la vida post-natal. Este patrón de expresión resulta especialmente interesante ya que al día E15 se observa un incremento -

estadísticamente significativo- de aproximadamente 50 veces respecto al control, en los niveles de expresión de TGF β 3. Como recordaremos esta etapa coincide con la ventana de tiempo en que nacen las neuronas TRHérgicas, además, correlaciona de manera inversa con los niveles de expresión de TGF β 2 en esa misma etapa.



Por otro lado, el análisis de la expresión del mRNA de T β RII indica que los niveles del mRNA de este receptor son detectables desde etapas muy tempranas (E14) manteniendo niveles relativamente constantes a lo largo del desarrollo hipotalámico (Figura 9A). Asimismo, detectamos que durante el desarrollo, la expresión del mRNA de T β RI es detectable y constante entre los días E14-E17, período en que culmina el nacimiento e inicia la diferenciación terminal de neuronas TRHérgicas, sin embargo, dichos niveles tienden a disminuir –aunque no de manera significativa- a partir del día E18 manteniéndose hasta la etapa adulta. (Figura 9B). Este patrón de expresión, en el cual T β RII y T β RI se expresan de manera constitutiva a lo largo del desarrollo, parece ser un mecanismo eficiente para que la célula propague una señal en respuesta a TGF β .

Es importante destacar que la expresión del mRNA de las tres isoformas y los dos receptores analizados son también detectables en cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17) desde el inicio del cultivo y hasta los cuatro días del mismo todos ellos con niveles relativamente constantes (datos no mostrados).

Como mencionamos anteriormente, las principales moléculas ejecutoras involucradas en la transducción de señales activada por TGF β desde la membrana hasta el núcleo para regular la expresión de sus genes blanco son las proteínas Smad, por lo que decidimos analizar los niveles de expresión de las R-Smad (Smad2 y Smad3) a lo largo del desarrollo. Como podemos observar en la Figura 10, ambas proteínas se expresan a lo largo de la ontogenia hipotalámica, sin embargo, los niveles de Smad2 son mucho menores que los de Smad3 siendo casi imperceptibles a los siete días de nacimiento.

Figura 8. Patrón de expresión del mRNA de las isoformas TGF β 1, 2 y 3 durante el desarrollo en el hipotálamo de rata. Los niveles del mRNA de las diferentes isoformas TGF β 1 (A) TGF β 2 (B) y TGF β 3 (C) fueron determinadas mediante RT-PCR. En las gráficas cada punto representa un estadio en etapas embrionarias (E) desde el día 14 hasta el 21, post-natales (P) a los días 0, 7, 14 y 21 así como el adulto de 5 meses de edad (A). Para cada isoforma el control (100%) corresponde al estadio con niveles más bajos. En la parte superior se muestra una imagen representativa del gel de agarosa (2%) teñido con EthBr. Cada valor representa la media de por lo menos tres experimentos independientes \pm EE, con excepción de TGF β 2 en donde solo se representa el promedio de dos experimentos independientes. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA seguido de una comparación LSD considerando como significativo un valor *, $P < 0,05$.

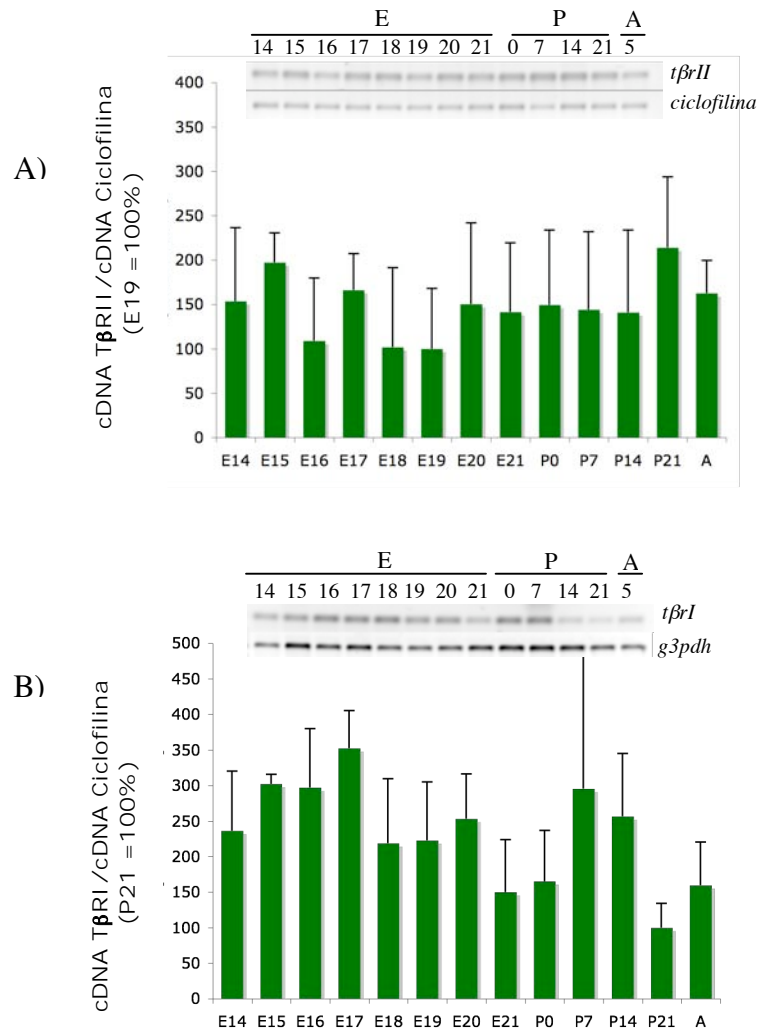


Figura 9. Patrón de expresión del mRNA de los receptores Tβ-RI y Tβ-RII durante el desarrollo en el hipotálamo de rata. Los niveles del mRNA del TβRII (A) y Tβ-RII (B)) fueron determinados mediante RT-PCR. Se emplearon hipotálamos en etapas embrionarias (E) desde el día 14 hasta el 21, post-natales (P) a los días 0, 7, 14 y 21 así como el adulto de 5 meses de edad (A). Arriba se muestra una imagen representativa del gel de agarosa teñido con EthBr. Las barras representan la media de tres a cinco experimentos independientes ± EE. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA seguido de una comparación múltiple LSD considerando un valor $P < 0,05$ como significativo.

Por otro lado, los niveles de expresión de Smad3 son sumamente elevados durante el desarrollo embrionario, sobre todo en etapas muy tempranas (E14) comenzando a disminuir al día E17 y manteniendo niveles relativamente constantes

hasta la vida post-natal. Estos datos sugieren que el efecto de TGF β en el hipotálamo esté mediado básicamente por Smad3

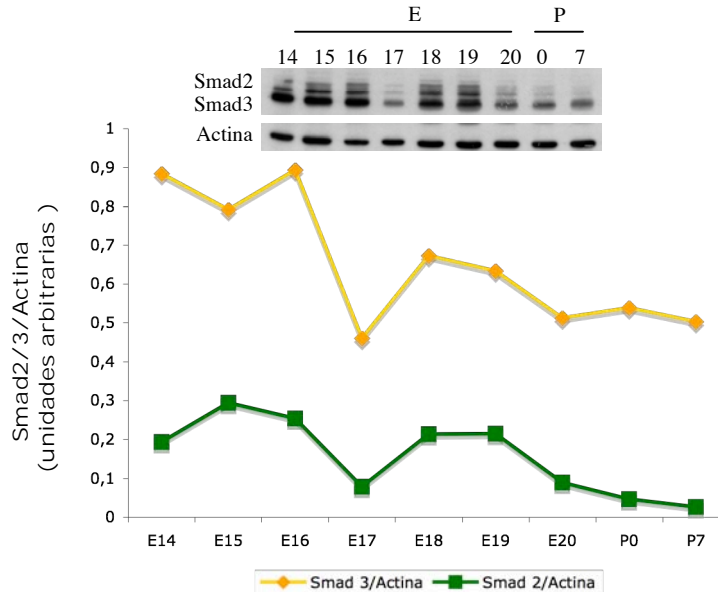
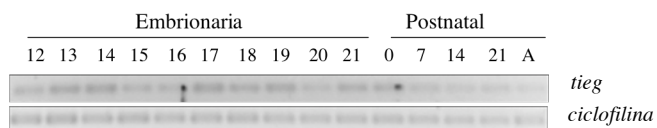


Figura 10. Patrón de expresión de las proteínas Smad 2/3 durante el desarrollo hipotalámico. El análisis por Western blot se realizó utilizando extractos nucleares de hipotálamo en diferentes estadios embrionarios (E) (14-20 días) y post-natales (P) (0 y 7) tal y como se describió en materiales y métodos. En la gráfica cada valor representa la relación entre la señal densitométrica para Smad2/3 corregida contra actina. El panel superior muestra la imagen representativa de Western blot utilizando anticuerpos anti-Smads2/3 y anti-actina.

Finalmente, debido a que el análisis del transcriptoma de las células TRHérgicas (Guerra-Crespo, 2004) realizado previamente en el laboratorio, muestra que el factor de transcripción TIEG1 se encuentra enriquecido en estas células en etapas embrionarias, decidimos determinar los niveles de expresión del mRNA de dicho factor. Al analizar cuatro experimentos independientes detectamos niveles significativos del mRNA de TIEG1 en hipotálamo fetal no sólo al día (E14) sino desde etapas más tempranas (E12) que además, coinciden con la ventana de nacimiento de neuronas TRHérgicas. Dichos niveles se mantienen relativamente constantes hasta el día P7, y muestran una tendencia a disminuir alrededor del 50% a partir de la segunda semana de vida permaneciendo así hasta la edad adulta (Figura 11).



CDNA

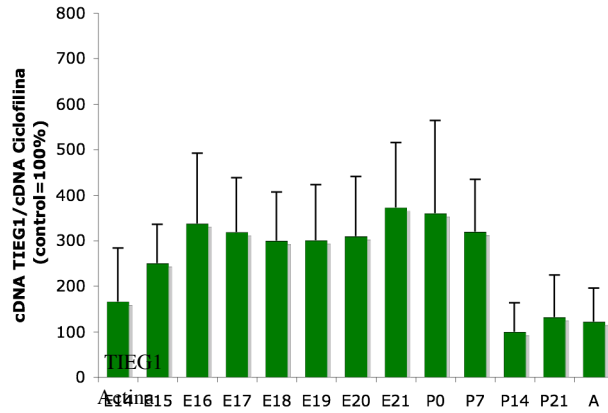


Figura 11. Patrón de expresión del mRNA de TIEG1 durante la ontogenia del hipotálamo de rata. El análisis por RT-qPCR se realizó mediante un análisis estadístico de p<0,05.

TIEG1/Actina (unidades arbitrarias)

El análisis por RT-qPCR se realizó mediante un análisis estadístico de p<0,05. El análisis estadístico se realizó mediante un análisis múltiple LSD considerando significativo un valor de p<0,05.

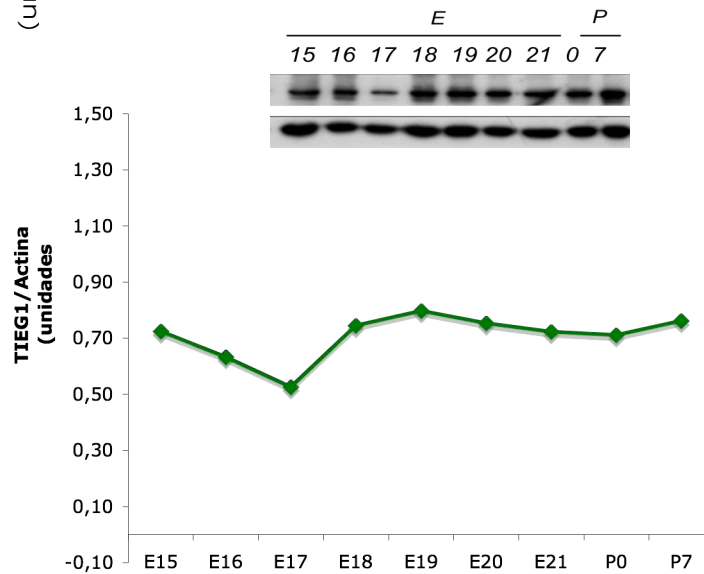


Figura 12. Patrón de expresión de la proteína TIEG1 durante el desarrollo hipotalámico. El análisis por Western blot se realizó utilizando extractos nucleares de hipotálamo en diferentes estadios embrionarios (E) (15-21 días) y post-natales (P) (0 y 7) tal y como se describió en materiales y métodos. En la gráfica cada valor representa la relación entre la señal densitométrica para TIEG1 respecto a los niveles de actina, utilizada como control de carga. El panel superior muestra la imagen representativa de Western blot utilizando anticuerpos anti-TIEG1 y anti-actina.

De igual forma, al analizar mediante Western blot los niveles de expresión de TIEG1 en extractos nucleares de hipotálamo, encontramos que durante el desarrollo embrionario y en la primer semana de vida post-natal, los niveles de expresión de

TIEG1 a nivel de proteína se mantienen relativamente constantes (Figura 12) tal y como sucede a nivel de mRNA.

Dado que componentes de la vía de señalización mediada por TGF β se expresan desde etapas tempranas durante el desarrollo hipotalámico (E14), y que TIEG1 esta presente en la ventana de tiempo en que nacen las neuronas TRHérgicas (E12-14), estos datos sugieren que el TGF- β juega un papel importante en la diferenciación de neuronas hipotalámicas y que probablemente este efecto esté mediado por el factor de transcripción TIEG1.

6.2 EFECTO DEL TGF β EN CULTIVOS PRIMARIOS DE HIPOTÁLAMO FETAL

Estudios diversos han demostrado que las diferentes isoformas de TGF β son capaces de regular la expresión del factor de transcripción TIEG1 (Subramaniam et al., 1995a, Tachibana et al., 1997) en fenotipos no neurales, por lo que quisimos determinar si en nuestro sistema esta citocina es capaz de regular la biosíntesis de TIEG1 *in vitro*. Utilizando cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17), evaluamos mediante RT-PCR la expresión del mRNA de TIEG1 en respuesta al estímulo con 2.5 ng/ml de las isoformas TGF β 2 y TGF β 3, concentración e isoformas con las cuales previamente observamos un efecto de TGF β en cultivos primarios hipotalámicos sobre los niveles del mRNA de TRH (datos no mostrados).

Nuestros datos muestran que la isoforma TGF β 2 incrementa aproximadamente 3 veces los niveles de expresión de TIEG1 al primer día de cultivo (días *in vitro*: DIV), disminuyendo al segundo día para nuevamente aumentar y alcanzar un incremento de 8 veces respecto a su control con la misma isoforma al 3 DIV (Figura 13). Estos datos coinciden con reportes previos (Subramaniam et al., 1995a), en donde se observo que en osteoblasto de humano, los niveles de expresión del mRNA de TIEG1 en respuesta al estímulo con TGF β se incrementan a las 24 horas descendiendo posteriormente. Sin embargo, también observamos que en nuestros cultivos a las 72 horas se observa un segundo incremento y de mayor intensidad al primero, el cual además es estadísticamente significativo. Estos datos demuestran que al igual que en otros fenotipos, los niveles de expresión del mRNA de TIEG1 en cultivos de hipotálamo

fetal son regulables por TGF β y en particular por la isoforma TGF β 2, mientras que la isoforma TGF β 3 no tiene ningún efecto, por lo menos en la misma ventana de tiempo.

Debido a que como se menciona anteriormente, los tres factores de transcripción incrementados en el análisis de los microarreglos de las células TRHérgicas son regulables por TGF β (King et al., 2003; Hefferan et al., 2000a; Kang et al., 2003), quisimos determinar si la adición exógena de las diferentes isoformas de TGF β , a una concentración de 2,5 ng/ml, es capaz de regular la biosíntesis de TRH, para lo cual utilizamos nuevamente cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17) y evaluamos los niveles del mRNA de TRH mediante RT-PCR.

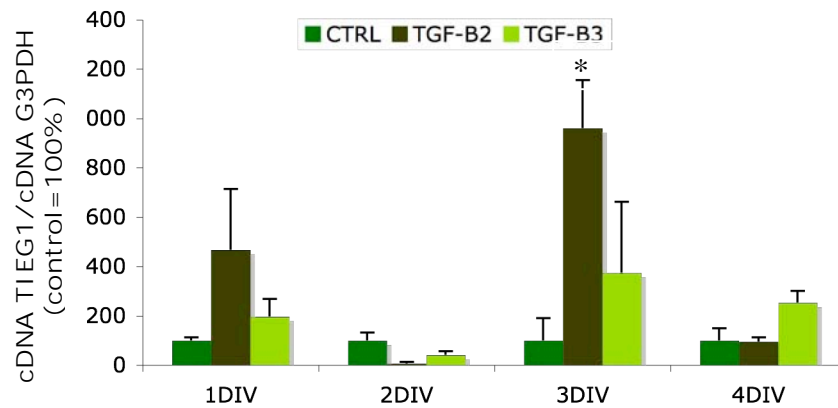


Figura 13. Cinética de expresión de TIEG1 bajo el efecto de TGF β en cultivo primario hipotalámico. Niveles de expresión del mRNA de TIEG en respuesta al tratamiento con 2.5 ng/ml de las isoformas II: ■ y III: ■ de TGF β . Cada barra representa una de las isoformas a los diferentes DIV. Los niveles del mRNA se determinaron por RT-PCR y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores se corrigieron contra los niveles del mRNA de G3PDH como control interno y se expresan como porcentajes respecto al control (100% ■) de células sin tratar. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA seguido de una prueba LSD. Valores de $p < 0,05$ (*) se consideraron como significativos ($n=3$)

Nuestros datos indican que las isoformas TGF β 2 y TGF β 3 inducen un incremento de aproximadamente el 100% en la expresión del mRNA de TRH al primer día de cultivo, mientras que al 3 DIV es únicamente el TGF β 2 el que incrementa –de manera estadísticamente significativa- en aproximadamente 3 veces los niveles de expresión del mRNA de TRH respecto a su control (Figura 14). Estos datos demuestran que tanto la isoforma TGF β 3 pero sobre todo el TGF β 2 regulan los niveles del mRNA de TRH con un efecto mucho mayor al 3 DIV, la correlación entre este incremento y los niveles detectados en la expresión del factor de transcripción

TIEG1 en respuesta al tratamiento con TGF β 2 al mismo día, apuntan nuevamente a que el efecto de TGF β pudiese estar mediado por el factor TIEG1.

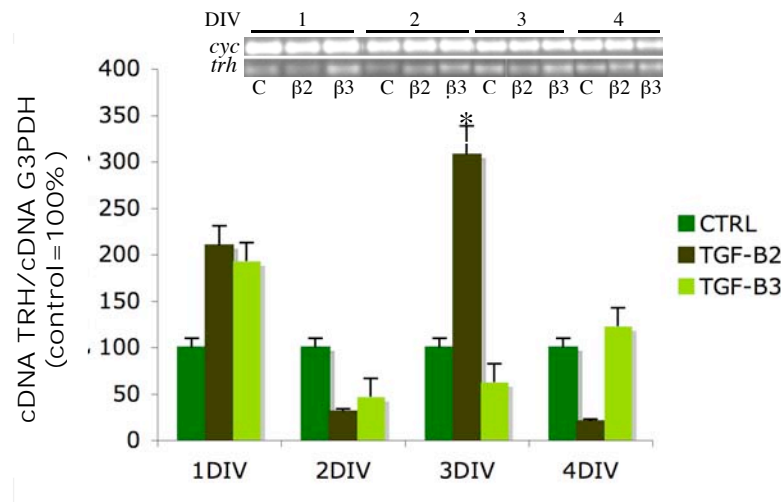


Figura 14. Cinética de la expresión del mRNA TRH en respuesta al estímulo con TGF β en cultivos primarios hipotalámicos. Respuesta del mRNA de TRH a una concentración de 2.5 ng/ml de las isoformas 2: ■ y 3: ■ de TGF β . Cada barra representa una de las isoformas a los diferentes DIV. Los niveles del mRNA se determinaron por RT-PCR en los tiempos indicados y se cuantificaron por densitometría asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores se corrigieron contra los niveles del mRNA de *g3pdh* como control interno y se expresan como porcentajes del control =100% ■ (n=3). En la parte superior de la Figura se muestra una fotografía representativa del gel teñido con bromuro de etidio para los productos de PCR (*) p<0,05.

Dado el espacio y tiempo de formación de los diferentes fenotipos hipotalámicos (Markakis, 2002), con el fin de identificar si el efecto observado con TGF β es exclusivo sobre el fenotipo TRHérgico, o incluye otros fenotipos hipotalámicos, decidimos analizar en los mismos cultivos la expresión del neuropéptido CRH, cuyas neuronas co-existen con TRH en el PVN y que además nacen en el mismo período. Como se observa en la Figura 15, los niveles de expresión del mRNA de CRH respecto a su control de células sin tratar se mantienen constantes durante los cuatro días que duró el cultivo con ambas isoformas de TGF β , lo cual demuestra que el incremento observado en los niveles de expresión del mRNA de TRH es específico para este fenotipo y que no abarca a otros fenotipos hipotalámicos, o por lo menos no a las neuronas CRHérgicas generadas en la misma ventana de tiempo que las neuronas TRHérgicas.

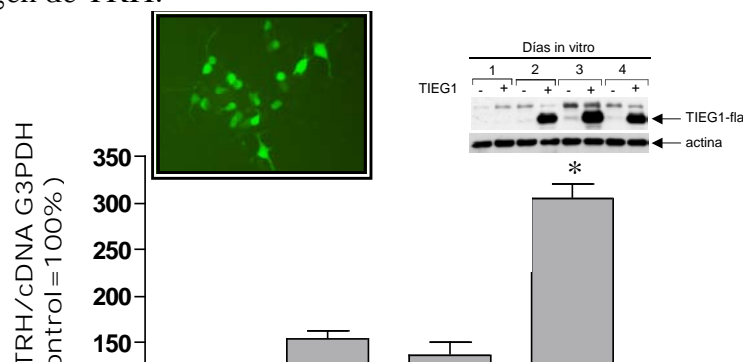


Figura 15. Cinética de CRH bajo el efecto de TGFβ en cultivo primario hipotalámico. Respuesta del mRNA de CRH a una concentración de 2.5ng/ml de las isoformas 2: ■ y 3: ■ de TGFβ. Cada barra representa una de las isoformas a los diferentes DIV. Los niveles del mRNA se determinaron por RT-PCR y se cuantificaron por densitometria asistida por computadora en unidades arbitrarias. Los valores se corrigieron contra los niveles del mRNA de G3PDH como control interno y se expresan como porcentajes del control =100% ■ (n=3).

6.3 EFECTO DE TIEG1 SOBRE LA EXPRESIÓN DEL MRNA DE TRH

De acuerdo a los datos obtenidos en los microarreglos, en donde uno de los transcritos incrementados en las neuronas TRHérgicas es TIEG1, quisimos determinar el papel de dicho factor de transcripción en los niveles de expresión del mRNA de TRH. Para lo cual, utilizamos el vector pCDNA-TIEG1 (Jonhnsen et al., 2002) que expresa TIEG1 fusionado a una etiqueta de Flag. Debido a la baja eficiencia con que se pueden transfectar cultivos primarios, decidimos utilizar la línea celular CA77 -un carcinoma que expresa de manera constitutiva TRH (Sevarino et al., 1988), la cual fue transfectada de manera transitoria con el vector de expresión de TIEG1.

Tal y como observamos en la Figura 16, la sobre-expresión de TIEG1 induce un incremento del 50%, respecto al control de células no transfectadas, en los niveles de expresión del mRNA de TRH desde las 48 hrs, alcanzando niveles máximos (300%) 96 hrs post-transfección. En el panel superior derecho de la misma figura, podemos observar una imagen representativa del Western blot, en el que mediante un anticuerpo anti-Flag se corrobora la sobre-expresión de TIEG1 desde las 48 hrs. Estos datos apuntan nuevamente, a que TIEG1 juega un papel importante en la regulación de la expresión del gen de TRH.



*
* *

Figura 16. Determinación de los niveles del mRNA de TRH en respuesta a la sobre-expresión de TIEG1 en las células CA-77. Las células CA-77 fueron transfectadas con el vector pcDNA-Flag-TIEG1 y los niveles del mRNA de TRH se determinaron por RT-PCR a los tiempos que se indican. En paralelo se prepararon extractos totales a partir de células transfectadas bajo las mismas condiciones y se determinó la expresión de TIEG1 por Western-blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-flag. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina (panel superior derecho). En el panel superior izquierdo, micrografía de células CA-77 expresando la proteína verde fluorescente (control de transfección) cuatro días post-transfección. . El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA seguido de una prueba LSD. Valores de $p,0,001$ (*) se consideraron como significativos ($n=3$).

6.4 REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE TRH *IN VITRO*

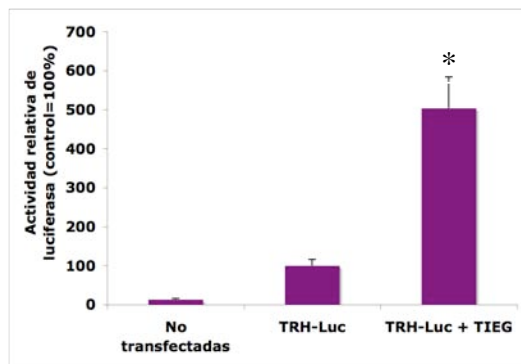
Con el fin de dilucidar si el efecto observado con TIEG1 es debido a que este factor regula la transcripción del gen de TRH utilizamos nuevamente cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17), en donde realizamos ensayos de co-transfección con los vectores TRH-Luc (Balkan et al., 1998) que expresa el gen reportero de luciferasa bajo la región promotora mínima de TRH y el vector de expresión pCDNA-TIEG1.

Como observamos en la Figura 17A, en presencia de suero, la actividad de luciferasa se incrementa hasta cinco veces al sobre-expresar TIEG1 comparado con las células transfectadas únicamente con el vector TRH-Luc. Debido a que para el tratamiento con TGF β debe impedirse la interferencia del TGF β y otros factores solubles presentes en el suero, analizamos el efecto de la sobre-expresión de TIEG1 en su ausencia. En esta condición TIEG1 incrementa la actividad del promotor de TRH hasta 15 veces respecto a su control (Figura 17B). Estos datos demuestran que el factor de transcripción TIEG1 es capaz de regular de manera positiva la actividad transcripcional del promotor mínimo de TRH, en el cual encontramos cuatros posibles elementos de unión para factores del tipo KLF como TIEG1 (Figura 7).

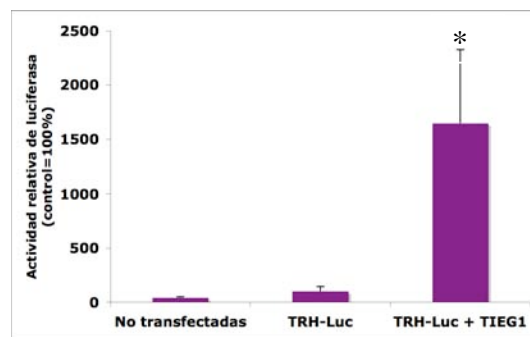
Para definir si los incrementos observados con TGF β 2 a nivel del mRNA de TRH se deben a que esta citocina regula la actividad transcripcional del promotor de TRH, determinamos la actividad de luciferasa en cultivos tratados con TGF β . Como se puede observar en la Figura 18A, la isoforma TGF β 2 duplica -de manera estadísticamente significativa- la actividad de luciferasa respecto a la actividad observada en las células no tratadas. Por su parte, en cultivos tratado con TGF β 3 la actividad de luciferasa no presenta variaciones respecto al mismo control (Figura 18A). Estos datos correlacionan con lo observado previamente en donde los principales efectos sobre el mRNA de TRH (Figura 14) y TIEG1 (Figura 13) se observan fundamentalmente con la isoforma TGF β 2 y no con TGF β 3.

Finalmente quisimos determinar si en nuestro sistema, el TGF β es capaz de regular la actividad de TIEG1 como factor de transcripción, para lo cual el mismo tipo de cultivo, tres días post-transfección, fue tratado con las isoformas 2 y 3 de TGF β durante 24 hrs para posteriormente monitorear la actividad de luciferasa. Como podemos observar en la Figura 18B, observamos nuevamente que la sobre-expresión de TIEG1 induce un aumento de aproximadamente 3 veces la actividad de luciferasa, respecto a las células control, sin embargo, también observamos que a diferencia de lo esperado, el tratamiento con TGF β 2 y TGF β 3 en células que sobre-expresan TIEG1 no incrementa la actividad de luciferasa observada respecto a las células que solamente sobre-expresan dicho factor de transcripción, lo cual podemos atribuir a dos causas principales: a) que en estas condiciones, TIEG1 se encuentre en concentraciones saturantes y el tratamiento con TGF β no sea suficiente para inducir un incremento en la actividad de luciferasa; o bien b) que el efecto de TGF β no este mediado por TIEG1.

A)



B)



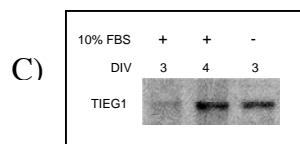


Figura 17. Regulación de la actividad del promotor de TRH por el factor de transcripción TIEG1. Células hipotalámicas a una densidad de 2×10^5 (1DIV) fueron transfectadas transitoriamente con TRH-Luc solo o en combinación con el vector de expresión TIEG, tal y como se describió en materiales y métodos. La actividad de luciferasa se determinó 96 hrs después de la transfección (a) en presencia o (b) en ausencia de suero y fue normalizada con la actividad de β -galactosidasa por μg de proteína. Los datos graficados corresponden al promedio de dos experimentos independientes \pm E.E. (n=4) (c) La sobreexpresión de TIEG1 fue determinada tanto en presencia como en ausencia de suero mediante Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Flag. El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA (*) $p < 0,05$ comparado contra TRH-Luc.

6.5 SILENCIAMIENTO DE TIEG1 MEDIANTE siRNA

Para confirmar que el efecto observado con $\text{TGF}\beta 2$ sobre la expresión del gen de TRH es mediado por TIEG1, transfectamos diferentes concentraciones del siRNA dirigido contra TIEG1 en cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17), para posteriormente ser tratados con 2.5 ng/ml de $\text{TGF}\beta 2$ y monitorear la expresión del mRNA de TIEG1 endógeno, el cual esperábamos disminuir al aumentar la concentración del siRNA. En paralelo analizamos la expresión del mRNA de TRH, así como la de G3PDH y/o ciclofilina como control de especificidad del interferente, además de utilizar dichos genes para normalizar la expresión de TIEG1 y TRH.

Si bien, tuvimos algunos problemas técnicos para lograr introducir el siRNA a las células, así como para determinar la eficiencia de transfección, 48 hrs post-transfección con 100 nM del siRNA, conseguimos un silenciamiento a nivel de mRNA de TIEG1 de aproximadamente el 60% respecto a los cultivos no transfectados (datos no mostrados). Sin embargo, estos datos son esencialmente idénticos a los obtenidos con la transfección, de manera independiente, de dos siRNAs irrelevantes, a las mismas concentraciones y durante el mismo período, por lo que aún es necesario refinar esta técnica a fin de determinar el papel de TIEG1 en la expresión de TRH.

*

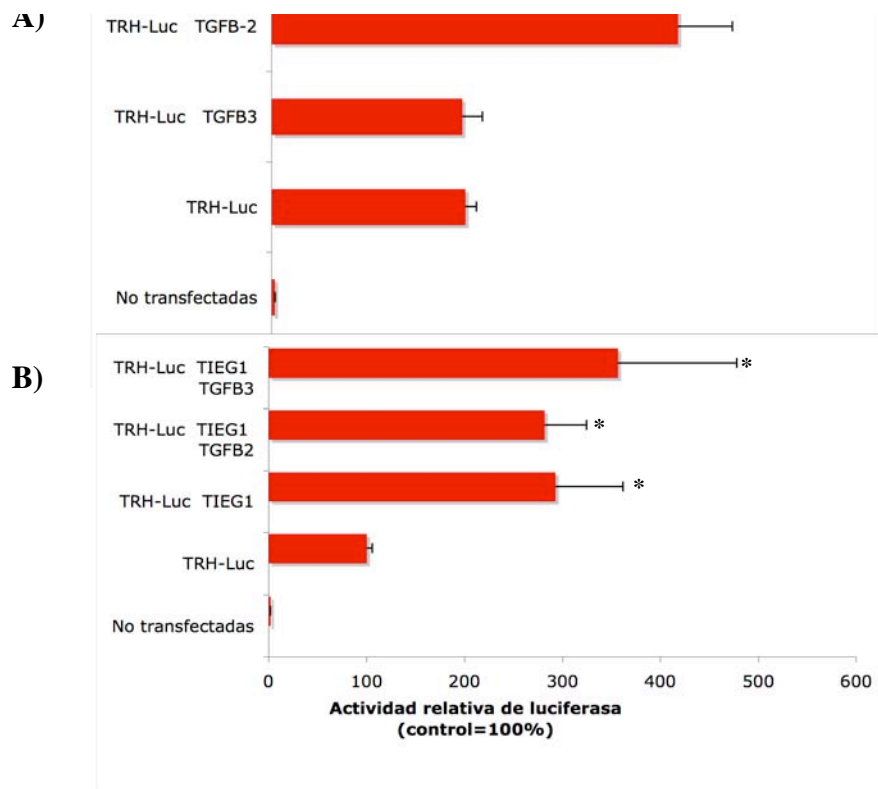


Figura 18. Regulación de la actividad del promotor de TRH por TIEG1 y TGF β . Cultivos primarios (E17) fueron transfectados con el gen reportero TRH-Luc y TIEG1, como se describió en materiales y métodos. 72 h después de la transfección las células fueron tratadas con TGF β 2.5 ng/ml. La actividad de luciferasa se determinó a las 24 hrs a partir de extractos totales. Los datos fueron corregidos contra la actividad de β -Gal por μ g de proteína y graficados como porcentaje respecto al control. Los datos corresponden a un experimento por triplicado. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba t de Student para datos no pareados (A) o mediante ANOVA (B) considerando un valor $p < 0,05$ como significativo (*) respecto a TRH-Luc.

6.6 INTERACCIÓN DEL PROMOTOR DE TRH CON EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TIEG1 *IN VIVO*

La habilidad de TIEG1 para trans-activar el gen de TRH de manera específica en cultivos primarios de hipotálamo fetal, así como el patrón de expresión de dicho factor en estos cultivos sugiere una interacción directa entre TIEG1 y el promotor de TRH *in vivo*. Para corroborar esta hipótesis, realizamos ensayos de CHIP (a partir de hipotálamos E17) utilizando un anticuerpo policlonal anti-TIEG1. Tras la purificación del DNA éste fue amplificado mediante PCR utilizando tres juegos de oligonucleótidos (Figura 19A) diseñados a partir del promotor mínimo de TRH, denominados P1, P2 y P3 los cuales se ha demostrado que *in vivo* unen proteínas de la familia KLF como Klf4 y Sp1 (Pérez-Monter, manuscrito en preparación); asimismo, se emplearon oligonucleótidos para amplificar el T β RII como control de especificidad.

En la Figura 19B observamos que TIEG1 se une indistintamente a los cuatro posibles sitios de unión presentes en la región promotora mínima de TRH. Si bien no es posible diferenciar entre la unión a las primeras cajas GC y CACCC (P1) destaca un

mayor enriquecimiento de la fracción inmunoprecipitada con la segunda caja GC (P3). Adicionalmente se demostró que la unión de TIEG1 es específica para sus secuencias consenso, ya que el uso del anticuerpo para TIEG1 es incapaz de unirse al gen de T β -RII. Estos experimentos demuestran que TIEG1 se une *in vivo* a la región promotora de TRH al día E17, período en que comienza la diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico.

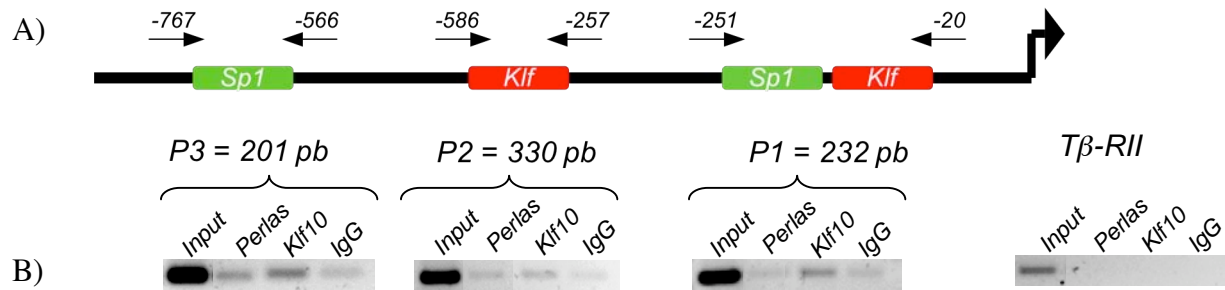


Figura 19. Interacción *in vivo* del TIEG1 con el promotor de TRH. Para confirmar la interacción de TIEG1 con los posibles sitios de unión en el promotor de TRH, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de cromatina. A) Oligonucleótidos diseñados a partir del promotor de TRH. P1 -flanquea la región -125/-20 que contiene una caja GC y la secuencia consenso CACCC-, P2 -flanquea la región -586/-257 que contiene la segunda caja CACCC- y P3 -flanquea la región -767/-566 y que contiene la segunda caja GC- y generan productos de 232, 330 y 201 pb respectivamente. B) Ensayos de ChIP utilizando hipotálamos de rata de 17 días de gestación y 4 μ g del anticuerpo policlonal anti-TIEG1. La amplificación por PCR se realizó tomando como templados: Input-DNA no inmunoprecipitado; Klf10-DNA recuperado de la inmunoprecipitación, Perlas-DNA control procesado sin anticuerpo; e IgG-DNA control procesado con un anticuerpo irrelevante.

6.7 CULTIVO DE EXPLANTE DE CEREBRO DE RATA

Si bien los datos presentados hasta el momento, se enfocan a la etapa de diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico, el patrón de expresión de TIEG1 en etapas tempranas durante el desarrollo (Figura 11), así como datos preliminares en los que se observa que este factor se une *in vivo* al promotor de TRH, sugieren fuertemente que TIEG1 juega un papel importante en el establecimiento del fenotipo TRHérgico.

Con el fin de corroborar el papel de este factor de transcripción temprano en el desarrollo, estandarizamos las condiciones del cultivo de explante de diencéfalo-telencefalo de rata al día E12, el cual se mantuvo durante 2 o 3 DIV, para posteriormente monitorear la expresión de algunos marcadores mediante RT-PCR. Como observamos en la Figura 20, la expresión del mRNA de nestina, un marcador de

progenitores neurales, es detectable desde el inicio del cultivo y durante el tiempo que duró el mismo. Asimismo, observamos que la expresión de β -tubulina III y enolasa, ambos marcadores de células neuronales jóvenes y maduras, respectivamente, es también detectable desde el inicio del cultivo, y que su expresión se incrementa al transcurrir el tiempo, patrones de expresión semejantes a lo que sucede a lo largo del desarrollo, y que se puede constatar con la expresión de dichos marcadores en hipotálamos de etapas embrionarias y en el adulto.

Monitoreamos la expresión de marcadores para fenotipos neuronales específicos hipotalámicos y no hipotalámicos, como TRH, CRH y TH, los cuales son también detectables y se incrementan a través del tiempo de cultivo, lo cual indica que este cultivo se desarrolla de manera similar a lo que sucede durante el desarrollo. De igual forma, determinamos si en estas condiciones se expresan las diferentes isoformas de TGF β , los receptores T β RI, T β RII y el factor de transcripción TIEG1, como se observa en la Figura 20, es nuevamente la isoforma TGF β 2 la que se expresa con mayor abundancia al tercer día de cultivo, lo cual correlaciona con el incremento observado en la expresión de TIEG1 en el mismo período, todo esto tomando la expresión de G3PDH como control interno.

A través del cultivo de explante expresamos altos niveles de marcadores, tanto de progenitores neurales como de fenotipos específicos, dentro y fuera del hipotálamo, por lo que éste constituye una excelente herramienta para dilucidar no sólo el papel de TIEG1 y TGF β , sino de otras moléculas en procesos de desarrollo y regulación.

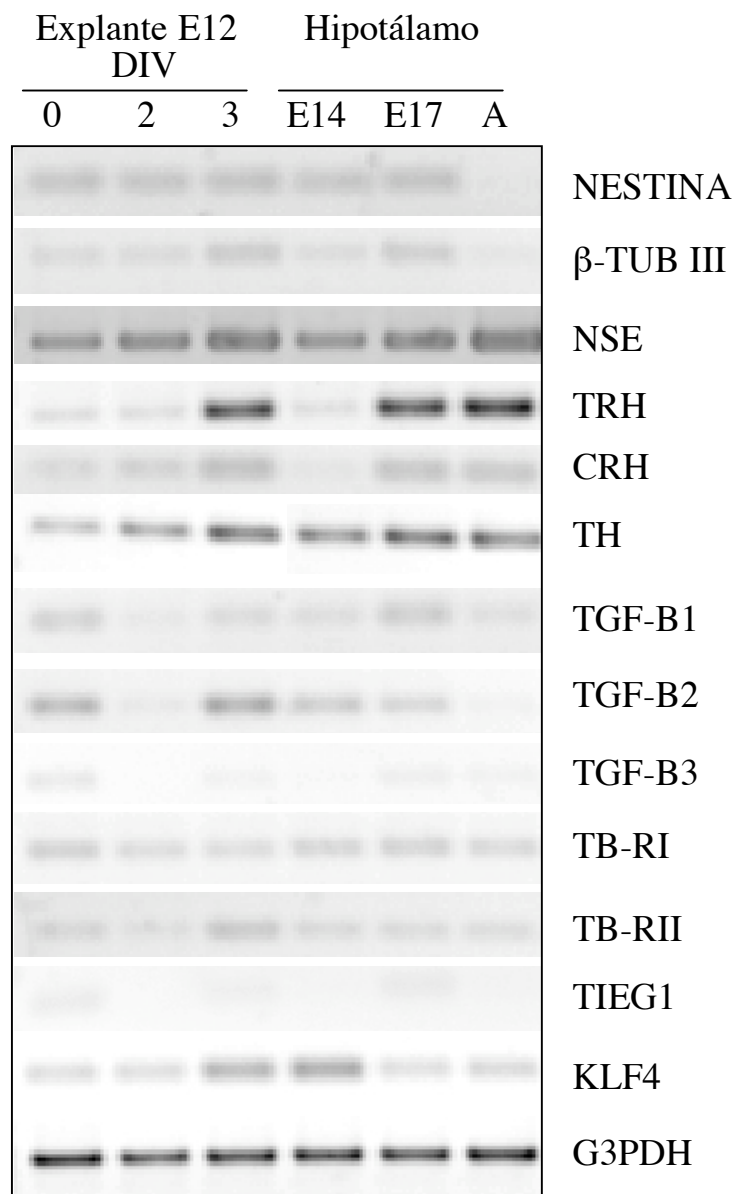


Figura 20. Caracterización del cultivo de explante. Los explantes realizados a partir de embriones de rata (E12) se mantuvieron durante 2 o 3 DIV, para posteriormente ser analizados mediante RT-PCR, utilizando hipotálamos de E14, E17 y Adulto (5 meses) como controles de expresión así como *g3pdh*.

7 DISCUSIÓN

El hipotálamo integra múltiples señales tanto de la periferia como del propio cerebro controlando la síntesis y liberación de hormonas requeridas para el crecimiento, reproducción, conducta y metabolismo de los organismos. Sin embargo, a pesar del papel que juegan en el mantenimiento de la homeostasis, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que participan durante el establecimiento y/o mantenimiento de los diferentes fenotipos neuronales hipotalámicos.

Este trabajo resulta novedoso al proponer a TGF β como una molécula involucrada en el desarrollo de las neuronas TRHérgicas hipotalámicas, en base a: 1) que el patrón de expresión de las isoformas y receptores de TGF β coincide con la etapa de establecimiento-diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico; 2) que en el mismo período se expresan las proteínas Smad2/3, principales ejecutoras en la vía de señalización clásica de TGF β ; 3) que el tratamiento con TGF β 2 incrementa los niveles de expresión del mRNA de TRH *in vitro* al regular la tasa de transcripción del promotor mínimo de TRH. Más aún, a fin de dilucidar el mecanismo a través del cual esta citocina pudiese estar actuando, observamos que en nuestro sistema el TGF β regula la expresión del factor de transcripción TIEG1, el cual no sólo transactiva al gen de TRH sino que se une *in vivo* al promotor de TRH.

7.1 TGF β Y LA DIFERENCIACIÓN DEL FENOTIPO TRHÉRGICO

El TGF β constituye una superfamilia de citocinas multifuncionales, implicadas en procesos como la morfogénesis, diferenciación celular y remodelación de tejidos. Durante el desarrollo, se ha demostrado que el TGF β es un importante regulador del ciclo celular de progenitores neurales en el SNC (Lu et al., 2005). Además, regula la migración celular en la corteza cerebral (Siegenthaler y Millar, 2004), así como la especificación y sobrevivencia de neuronas TH⁺ en el cerebro medio (Farkas et al., 2003, Poulsen et al., 1994). A nivel del hipotálamo, se ha demostrado que TGF β 1 regula la expresión de los genes POMC y GnRH en la edad adulta (Bouret et al., 2001, Bouret et al., 2004). Sin embargo el papel de esta molécula en el

establecimiento y/o mantenimiento de fenotipos neuronales hipotalámicos aún se desconoce.

En este estudio demostramos no sólo que las tres isoformas de TGF β se expresan en el hipotálamo de la rata a lo largo del desarrollo, sino que además lo hacen con patrones bien definidos. Si bien el TGF β 1 se expresa de manera casi constante desde etapas embrionarias y hasta la vida adulta, las isoformas TGF β 2 y TGF β 3 tienen patrones de expresión mucho más dinámicos. Destaca especialmente un pico máximo de expresión de TGF β 3 al día E15 el cual disminuye drásticamente a niveles casi imperceptibles durante el resto de la etapa embrionaria. Este incremento, además de ser opuesto a los niveles de expresión de TGF β 2 en el mismo estadio, coincide con el período de nacimiento de las neuronas TRHérgicas hipotalámicas. El aumento observado en la expresión de TGF β 3 y su subsecuente descenso nos hacen pensar que muy probablemente TGF β 3 sea una molécula necesaria durante el nacimiento, cuya función sea activar a otras moléculas importantes para el desarrollo del fenotipo TRHérgico.

Asimismo, observamos que el incremento observado, tanto en los niveles del mRNA de TRH en cultivos primarios de hipotálamo fetal (E17) como en la actividad del gen reportero de luciferasa, ambos en respuesta al tratamiento con TGF β 2 pero no con TGF β 3 correlacionan con la expresión de TGF β 2 en éste estadio del desarrollo *in vivo* así como con la casi nula expresión TGF β 3 en el mismo período. Estos datos resultan interesantes si consideramos que en el hipotálamo adulto, la expresión de GnRH y POMC se regula por el TGF β 1 y no por las isoformas TGF β 2 y TGF β 3, lo cual apunta a que estas citocinas actúan de manera regulada a lo largo del desarrollo (Bouret et al., 2004, Bouret et al., 2001).

De igual forma, el patrón de expresión de los receptores, en donde el T β RII se mantiene relativamente constante, mientras que el T β RI sea aquel que muestra niveles mas elevados durante las etapas mas tempranas del desarrollo (E14-E17) período en que aún están naciendo las neuronas TRHérgicas, nos llevan a pensar nuevamente que TGF β pudiese estar participando de manera importante durante el desarrollo hipotalámico, inclusive con un papel doble, ya sea en el mantenimiento del fenotipo

TRHérgico o bien como una molécula inductora del mismo tal y como sucede para las neuronas TH⁺ del mesencefalo (Farkas et al., 2003).

7.2 POSIBLES MECANISMOS DE ACCIÓN DE TGFβ PARA REGULAR EXPRESIÓN DEL mRNA DE TRH?

El análisis de ratones nulos para la expresión de las diferentes isoformas de TGFβ o sus receptores no muestra un fenotipo sobre el desarrollo del SNC (Letterio et al., 1994; Oshima et al., 1996; Sanford et al., 1997). Lo anterior ha sido asociado a un efecto compensatorio entre las diferentes isoformas, por lo que será necesario utilizar otras estrategias como anticuerpos neutralizantes (para bloquear el efecto de las tres isoformas) o siRNA (en combinaciones específicas, vg. TGFβ2 y TGFβ3) a fin de determinar el papel de TGFβ durante el desarrollo hipotalámico. Sin embargo, nuestros datos proveen fuerte evidencia acerca de tres probables mecanismos a través de los cuales TGFβ pudiese regular la expresión del gen de TRH en la fase de diferenciación terminal.

La vía de señalización clásica: las proteínas Smad

Las proteínas de la familia Smad han sido identificadas como las principales mediadoras de la señal de TGFβ desde el citoplasma hasta el núcleo. Tras la fosforilación directa a través del TβRI, las Smad2 y/o Smad3 se unen a Smad4 para formar un complejo trimérico y traslocarse al núcleo, regulando la transcripción de sus genes blanco (Böttner et al., 2000).

Los altos niveles de expresión de Smad3, y no de Smad2, en etapas tempranas durante el desarrollo hipotalámico, resultan especialmente interesante ya que entre ambas moléculas, solamente Smad3 es capaz de unirse al DNA (Yagi et al., 1999), por lo que el incremento en Smad3 nuevamente sugiere que la vía de señalización de TGFβ esta presente y probablemente activa en células hipotalámicas. Estos datos junto con el incremento observado en los niveles del mRNA de TRH y en la actividad de luciferasa tras el tratamiento con TGFβ2, apuntan a que TGFβ a través de la vía canónica regula la expresión del gen de TRH, no sólo en la etapa de diferenciación terminal, sino

inclusive en etapas mucho más tempranas, en donde se da la especificación del fenotipo, tal y como lo sugiere la expresión de estas moléculas en el cultivo de explante.

La presencia de dos elementos de unión para proteínas Smad (SBE) (5'-GTCTAGAC-3') en la región promotora del gen de TRH (-1167/-1175 y -1807/-1816), sugiere que TGF β regula de manera directa la actividad del gen de TRH, sin embargo, es importante destacar que estos elementos se encuentran fuera de la región promotora mínima empleada en los ensayos de luciferasa, no obstante, podemos observar un incremento de aproximadamente 100% respecto al control, tanto en los niveles del mRNA de TRH como en la actividad de luciferasa, ambos tras el tratamiento con TGF β . Estos datos proponen varios escenarios -ninguno mutuamente excluyente- a través de los cuales TGF β puede ejercer su efecto: a) que la unión de TGF β a sus receptores active a las proteínas Smads y estas actúen como las principales ejecutoras regulando directamente la expresión del gen de TRH a través de la unión a los SBE, lo cual explica el incremento en los niveles del mRNA de TRH; b) que las proteínas Smad activas funcionen sólo como transductoras de la señal regulando la expresión de factores de transcripción que actúen directamente sobre el gen de TRH como Brn2, Sim1/2 o Arnt, cuya función es determinante para el desarrollo hipotalámico (Schonemann et al., 1995; Michaud et al., 1998; Michaud et al., 2000) o bien TIEG1 y Klf4, los cuales son blancos de la vía de TGF β (King et al., 2003) y además resultaron incrementados en el análisis del transcriptoma de células TRHérgicas (Guerra-Crespo, 2004), siendo este mecanismo responsable del incremento observado a nivel de actividad transcripcional de TRH; c) que las Smads sean activadas por otras vías de señalización distintas a TGF β y que estas ejerzan su efecto por alguno de los mecanismos anteriores tal y como sucede en neuronas hipocampales, donde BDNF activa la vía de las MAPK induciendo la fosforilación de Smad3 (Lu et al., 2005) o bien; d) que el efecto de TGF β sea la activación -mediante un mecanismo independiente de Smads- de otros factores de transcripción como TIEG1. Este se apoya en observaciones recientes hechas en queratinocitos de humano y células de hepatoma, en donde el TGF β activa a la proteína cinasa C α (PKC α), la cual a su vez fosforila a la proteína regulatoria S100C/A11, que al trasladarse al núcleo se une a Sp1

reclutándolo en el promotor de los genes *p15* y *p21*, ambos importantes reguladores del ciclo celular (Miyazaki et al., 2004; Sakaguchi et al., 2004).

El gen inducido tempranamente por TGF β (TIEG1)

El incremento observado en la expresión del mRNA de TIEG1 en respuesta al tratamiento con TGF β , aunado al efecto observado al sobre-expresar este factor de transcripción tanto en los niveles del mRNA como en la actividad de luciferasa, apuntan a que uno de los factores que pudiesen regular el efecto de TGF β sobre la actividad del gen de TRH es TIEG1.

Estudios previos han demostrado que en células de osteosarcoma la sobreexpresión de TIEG1 mimetiza los efectos observados con TGF β (Tachibana et al., 1997; Cook y Urrutia, 2000) y que dicho efecto está mediado, en parte, por la regulación negativa que ejerce sobre la proteína inhibitoria Smad7, lo cual concuerda con su papel de represor transcripcional (Johnsen et al., 2002a). Asimismo se ha observado que TIEG1 también es capaz de regular la expresión y grado de fosforilación de Smad2 (Johnsen et al., 2002b).

Dentro del sistema nervioso, estudios recientes han demostrado que en respuesta a BMP2, TIEG1 regula la expresión del gen N-myc induciendo así la salida del ciclo celular y promoviendo la apoptosis en precursores neurales de cerebelo; sin embargo, la sobre-expresión de TIEG1 no afecta el proceso de diferenciación (Alvarez-Rodríguez et al., 2007).

Al igual que otros miembros de la familia de los KLFs, el efecto de TIEG1 ya sea como inhibidor o transactivador de sus genes blanco está mediado básicamente por la unión de este factor de transcripción a las secuencias CACCC o bien a cajas ricas en GC (Ou et al., 2004; Chrisman y Tindall, 2003) como las presentes en la región promotora mínima del gen de TRH (Figura 7).

En el presente trabajo, demostramos que la sobre-expresión de TIEG1 incrementa los niveles del mRNA de TRH en la línea celular CA77 y que este efecto es a través de regular la tasa de transcripción del promotor mínimo de TRH. Más aún, demostramos que TIEG1 es capaz de unirse *in vivo* a los cuatro posibles sitios de unión del tipo CACCC o cajas GC dentro de la región promotora mínima del gen de TRH,

tanto en la etapa de diferenciación terminal como en el establecimiento del fenotipo; sin embargo, esta unión es mucho mayor en la segunda caja GC. El alto grado de conservación de algunas de estas cajas en otras especies (ratón y humano) sugiere que dichas secuencias son críticas para la regulación del gen de TRH a través de TIEG1 -o bien de otros miembros de la familias de los KLFs-, además de representar un mecanismo de regulación mucho más general y conservado a lo largo de la evolución.

A pesar de que en nuestros ensayos no observamos un efecto sinérgico entre TGF β y TIEG1 sobre la actividad transcripcional del gen TRH, probablemente por la cinética de expresión de TIEG1 o bien por el tiempo al que TGF β ejerce su efecto, aún es necesario dilucidar si el principal regulador tanto de la expresión como de la actividad de TIEG1 es el TGF β . Sin embargo, datos previos generados en el laboratorio sugieren que otro posible regulador de la expresión del mRNA de TRH es el EGF, el cual induce respuestas rápidas y de igual magnitud a las observadas con BDNF en cultivos primarios de hipotálamo fetal tratados con este factor (Pérez-Martínez, datos no publicados). Estas observaciones, aunadas a reportes previos en que se observó que EGF regula los niveles de mRNA y proteína de TIEG1 (Subramaniam et al., 1995a), sugieren a este factor de crecimiento como otro posible regulador de la expresión de TIEG1 durante el desarrollo hipotalámico.

El factor neurotrófico derivado del cerebro: BDNF

Estudios muy preliminares realizados en el laboratorio sugieren que el BDNF es blanco de TGF β en cultivos primarios de hipotálamo fetal (Pérez-Martínez, datos no publicados). Asimismo, hemos observado que si bien los niveles de expresión del mRNA de BDNF en el hipotálamo son detectables desde etapas muy tempranas durante el desarrollo, estos tienden a incrementarse a partir del día E19 disminuyendo drásticamente en el adulto (Pérez-Martínez, datos no publicados). Estos datos, aunados a reportes previos de nuestro laboratorio en donde se demostró que el BDNF es capaz de regular la expresión del gen de TRH en cultivos primarios de hipotálamo fetal, (Guerra-Crespo et al., 2001) sugieren que TGF β puede estar actuando en etapas tempranas durante el desarrollo, en el establecimiento del fenotipo TRHérgico, pero al

mismo tiempo, puede estar regulando la expresión de BDNF cuyo efecto se observa posteriormente, durante la etapa de diferenciación terminal del fenotipo TRHérgico.

7.3 MODELO DE ACCIÓN PROPUESTO PARA LA DIFERENCIACIÓN DEL FENOTIPO TRHÉRGICO

Estudios muy recientes realizados dentro del laboratorio, en los cuales se realizaron mutaciones en los elementos de respuesta CACCC o cajas GC, presentes en el promotor mínimo de TRH, de manera individual o en distintas combinaciones, demuestran la importancia que dichas secuencias tienen para la expresión del gen de TRH (Pérez-Monter, manuscrito en preparación). Asimismo, se ha demostrado que los factores Klf4 y Sp1, ambos miembros de la familia de los KLFs, actúan de manera sinérgica en la regulación de la expresión del promotor mínimo de TRH, al cual también son capaces de unirse *in vivo*.

Estos datos en conjunto con los generados en el presente trabajo, sugieren que los KLFs (TIEG1, Klf4 y Sp1) pudiesen formar un complejo programa de diferenciación durante el desarrollo del fenotipo TRHérgico hipotalámico, en donde proteínas KLF con idénticas capacidades de unión al DNA pero distintas propiedades bioquímicas compiten por la ocupación del promotor de TRH a fin de regular su actividad transcripcional, tal y como se propone para la diferenciación de células troncales (Bruce et al., 2007)

Desde que el EKLF fue clonado en 1993 se han identificado hasta el momento 15 factores de transcripción del tipo KLF, los cuales regulan una amplia gama de procesos biológicos incluyendo proliferación celular, apoptosis, diferenciación, y tumorigenesis (Dang, 2000). Recientemente, se ha demostrado que la expresión de Klf4 en conjunto con Oct4, Sox2 y c-Myc es capaz de reprogramar fibroblastos a un estado pluripotente (Jiang et al., 2007).

Asimismo, se ha demostrado que tanto Klf4 (Evans et al., 2007), Klf6 (Li et al., 2005) y Klf1 (Zhang et al., 2001; Lee et al., 1999) interactúan con remodeladores de cromatina, como p300/CBP o SWI/SNF modificando el grado de acetilación de sus genes blanco regulando así su tasa de transcripción. Si bien esta evidencia plantea nuevas interrogantes acerca del mecanismo molecular a través del cual la vía TGFβ-

TIEG1 pudiese estar regulando la expresión del gen de TRH durante el desarrollo, el presente trabajo contribuye de manera importante a enriquecer el conocimiento existente sobre la regulación de la expresión del gen de TRH, proponiendo a TGF β y TIEG1 como dos nuevos reguladores que pueden actuar de manera coordinada o independiente durante el desarrollo hipotalámico (Figura 20).

8 CONCLUSIONES

- Las tres isoformas de TGF β , los receptores T β RI y T β RII, las proteínas Smad2/3 y el factor de transcripción TIEG1 se expresan desde etapas tempranas y a lo largo del desarrollo hipotalámico
- La isoforma TGF β 2 regula positivamente los niveles de expresión del mRNA de TRH en cultivos primarios de hipotálamo fetal.
- El TGF β 2 es capaz de regular los niveles de expresión del mRNA de TIEG en este mismo sistema
- La sobre expresión de TIEG1 y el tratamiento con TGF β 2 es capaz de regular la actividad transcripcional del gen de TRH; sin embargo no se observa un efecto sinérgico o aditivo
- El factor de transcripción TIEG1 se une al promotor de TRH *in vivo* en el hipotálamo E17.

9 PERSPECTIVAS

- Dilucidar si el TGF β endógeno juega un papel importante en la expresión del mRNA de TRH mediante el uso de anticuerpo anti-TGF β .
- Determinar el papel del factor de transcripción TIEG1 en el establecimiento del fenotipo TRHérgico, mediante el uso de siRNA.

10. REFERENCIAS

- Acampora D, MP Postiglione, V Avantaggiato, M Di Bonito, FM Vaccarino, J Michaud and A Simeone (1999). Progressive impairment of developing neuroendocrine cell lineages in the hypothalamus of mice lacking the Orthopedia gene. *Genes Dev.* **13**:2787-800
- Ahn J-I, K-H Lee, D-M Shin, J-W Shim, J-S Lee, S Chang, Y-S Lee, MJ Brownstein, S-H Lee and Y-S Lee (2004) Comprehensive transcriptome análisis of differentiation of embryonic ítem cells into midbrain and hindbrain neurons. *Dev Biol.* 265:491-501
- Altschul SF, TL Madden, AA Schäffer, J Zhang, Z Zhang, W Miller and DJ Lipman (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402
- Alvarez-Rodríguez R, M Barzi, J Berenguer & S Pons (2007) Bone Morphogenetic Protein 2 Opposes Shh-mediated Proliferation in Cerebellar Granule Cells through a TIEG-1-based Regulation of Nmyc. *J Biol Chem.* **282**: 37170-37180,
- Ambion (2006) Basics RT-PCR. The 10 most common quantitative RT-PCR pitfalls. Boletín técnico 165. <http://www.ambion.com>.
- Balkan W, MA Tavianini, PJ Gkonos and BA Roos (1998) Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology* **139**:252-259
- Botte MC, AM Chamagne, MC Carre, R Counis y ML Kottler (1998) Fetal expression of GnRH and GnRH receptor genes in rat testis and ovary. *J Endocrinol* **159**:179-189.
- Böttner M, K Krieglstein and K Unsicker (2000). The transforming growth factor- β s: structure, signaling and roles in nervous system development and functions. *J Neurochem.* **75**:2227-2240
- Bouret S, S de Seranno, JC Beauvillain and V Prevot (2004) Transforming growth factor betal may directly influence gonadotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 145:1794-1801
- Bouret S, MT Chuoi-Mariot van, V Prevot, D Croix, T Takumi, S Jegou, H Vaudry, JC Beauvillain and V Mitchell (2001) Evidence trans TGF β may directly modulate POMC mRNA expression in the female rat arcuate nucleus *Endocrinology* **142**:4055-4065
- Cartharius K, K Frech, K Grote, B Klocke, M Haltmeier, A Klingenhoff, M Frisch, M Bayerlein and T Werner (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis

- based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. **21**:2933-2942.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry* **162**:156-159
 - Christman HR and DJ Tindall. (2003) Identification and characterization of a consensous DNA bindng element for the zinc finger transcription factor TIEG/EGRalpha. *DNA Cell Biol* **22**:187-199
 - Cook, T and R. Urrutia. (2000) TIEG proteins join the Smads as TGF- β -regulated transcription factors that control pancreatic cell growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **278**:513-521
 - Dang DT, J Pevsner and VW Yang (2000) The biology of the mammalian Krüppel-like family of transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. **32**:1103-1121
 - De la Rosa-Velázquez IA, H Rincón-Arano, L Benítez-Bribiesca, F Recillas-Targa. Epigenetic regulation of the human retinoblastoma tumor suppressor gene promoter by CTCT. *Cancer Res*. **67**:2577-2585
 - Derynck R and YE Zhang (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signalling. *Nature*. **425**:577-584
 - Echavarria D, C Vieira and S Martínez (2001) Mammalian neural tube grafting experiments: an in vitro system for mouse experimental embryology. *Int J Dev Biol* **45**:895-902
 - Farkas LM , N Dunker, E Roussa, K Unsicker and K Krieglstein (2003) Transforming growth factor- β s are essential for the development of midbrain dopaminergic neurons in vitro and in vivo. *J Neurosci*. **23**:5178-5186
 - Figdor MC and CD Stern (1993) Segmental organization of embryonic diencephalon. *Nature* **363**:630-634
 - Flanders KC, Ludecke G, Engels S, Cisel DS, Roberts AB, Kondaiah P, Lafyatis P, Sporn MB and Unsicker K. (1991) Localization and actions of transforming growth factor-beta s in the embryonic nervous system. *Development* **113**:183-191
 - Freshney R-I (2000) Organotypic culture en *Culture of animal cells. A manual of Basic technique*. Wiley-Liss 395-406
 - Galter D, M Bottner and K Unsicker (1999) Developmental regulation of the serotonergic transmitter phenotpe in rostral and caudal pahe neurons by transforming growth factor- β s. *J Neurosci Res*. **56**:532-538
 - Guerra-Crespo, M., R. Ubieta, P. Joseph-Bravo, J.L. Charli, L. Perez-Martinez. (2001) BDNF increases the early expression of TRH mRNA in fetal TrkB+ hypothalamic neurons in primary culture. *Eur J Neurosci*. 2001; **14**:483-494.

- Guerra-Crespo M, JL Charli, VH Rosales-García, G Pedraza-Alva and L Pérez-Martínez (2003) Polyethylenimine improves the transfection efficiency of primary cultures of post-mitotic rat fetal hypothalamic neurons. *J Neuro Meth.* **127**:179-192
- Guerra-Crespo, M. (2004). Estudio de la biosíntesis de la TRH en etapa de diferenciación terminal en cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata. Tesis de Doctorado, UNAM
- Hefferan TE, GG Reinholz, DJ Richard, SA Johnsen KM Waters, M Subramaniam and TC Spelsberg (2000a). Overexpression of a nuclear protein, TIEG mimics transforming growth factor-beta action in human osteoblast cell. *J Biol Chem.* **275**:2025-20259
- Hefferan TE, M Subramaniam, S Khosla, BL Riggs and TC Spelsberg (2000b). Cytokine-specific induction of the TGF-beta inducible early gene (TIEG): regulation by specific members of the TGF-beta family. *J Cell Biochem.* **78**:380-390.
- Johnsen SA, M Subramaniam, R Janknecht, and TC Spelsberg (2002a). TGFbeta inducible early gene enhances TGFbeta/Smad-dependent transcriptional responses. *Oncogene* **21**:5783-5790
- Johnsen SA, M Subramaniam, T Katagiri, R Janknecht and TC Spelsberg (2002b) Transcriptional regulation of Smad2 is required for enhancement of TGFbeta/Smad signaling by TGFbeta inducible early gene. *J Cell Biochem* **87**:233-242
- Joseph-Bravo P, L Pérez-Martínez , L Lezama, C Morales-Chapa and JL Charli (2002) An improved method for the expression of TRH in serum-supplemented primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Brain Res Brain Res Rev* **9**:93-104
- Kandel E, J Schwartz and T Jessel. (2000) *Principles of Neural Science.* 4th Ed. McGraw Hill
- Kang Y, CR Chen, J Massagué (2003). A self-enabling TGFbeta response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells. *Mol Cell.* **11**:915-926.
- King KE, VP Iymere, PL Weissberg and CM Shanahan (2003). Kruppel-like factor 4 (KLF4/GKLF) is a target of bone morphogenetic proteins and transforming growth factor β 1 in the regulation of vascular smooth muscle cell phenotype. *J Biol Chem.* **278**:11661-11669
- Kiecker C and A Lumsden (2005) Compartments and their boundaries in vertebrate brain development. *Nature Reviews Neuroscience* **6**:553-564
- Krieglstein K, L Farkas and K Unsicker (1998) TGF- β regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins. *J Neurobiol* **37**:563-572

- Lee JE, SF Wu, LM Goering and RI Dorsky (2006) Canonical Wnt signaling through Lef1 is required for hypothalamic neurogenesis. *Development* **22**:451-461
- Lee MK, C Pardoux, MC Hall, PS Lee, D Warburton, J Qing, SM Smith and R Derynck (2007) TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J.* **26**:3957-3967
- Letterio JJ, AG Geiser, AB Kulkarni, NS Roche (1994) Maternal rescue of transforming growth factor-beta 1 null mice. *Science.* **264**:969-979
- Li P, X He, MR Guerrero, M Mok, A. Aggarwal and MG Rosenfeld (1993) Spacing and orientation of bipartite DNA-binding motifs as potential functional determinants for POU domain factors. *Genes Dev.* **7**:2483-2496.
- Lopez-Coviella I, TM Mellott, VP Kovacheva, B Berse, BE Slack, V Zemelko, A Schnitzler, JK Blusztajn. (2006) Developmental pattern of expression of BMP receptors and Smads and activation of Smad1 and Smad5 by BMP9 in mouse basal forebrain. *Brain Res.* **1088**:49-56.
- Lu J, Y Wu, N Sousa y OF Almeida (2005). SMAD pathway mediation of BDNF and TGF beta 2 regulation of proliferation and differentiation of hippocampal granule neurons. *Development* **132**:3231-3242
- Marín O and JLR Rubenstein (2002) Patterning, regionalization and cell differentiation in the forebrain. En *Mouse development patterning, morphogenesis and organogenesis.* Ed Janet Rossant. Academia Press
- Markakis EA (2002). Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol* **23**:257-291
- Markakis E and LW Swanson (1997). Spatiotemporal patterns of secretomotor neuron generation in the parvicellular neuroendocrine system. *Brain Res Brain Res Rev* **24** :255-291
- Massagué J, J Seoane and D Wotton (2005). Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**:2783-2810
- Mathieu J, A Barth, FM Rosa, SW Wilson and N Peyriéras (2002). Distinct and cooperative roles for Nodal and Hedgehog signals during hypothalamic development. *Development* **129**:3055-3065
- Michaud JL, C DeRossi, NR May, BC Holdener and C Fan (2000) ARNT2 acts as the dimerization partner of SIM1 for the development of the hypothalamus. *Mech Dev.* **90**:253-261.
- Michaud JL, T Rosenquist, NR May and C Fan (1998). Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev.* **15**:3264-3275.
- Noti JD, AD Jonson and JD Dillon (2004). The zinc finger transcription factor transforming growth factor beta-inducible early gene-1 confers myeloid-specific

- activation of the leukocyte integrin CD11d promoter. *J Biol Chem* **279**:26948-26958
- Odzmar B, R Bose, M Barrios-Rodiles, HR Wang, Y Zhang and JL Wrana (2005). Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*. **307**:1603-1609
 - Oshima M, H Oshima and MM Taketo (1996). TGF-beta receptor type II deficiency results in defects of yola sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Dev. Biol.* **179**:297-302
 - Ou XM, K Chem and JC Shih (2004). Dual functions of transcription factors, transforming growth factor-beta-inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidasa (MAO) B gene. *J Biol Chem* **279**:21021-21028
 - Pérez-Martínez L, JL Charli, P Joseph-Bravo (2001). Development of pro-TRH gene expresión in primary cultures of fetal hypothalamic cells. *Dev Brain Res***130**:73-81
 - Pérez-Martínez L, A Carreon-Rodriguez, ME Gonzalez-Alzati, C Morales, JL Charli and P Joseph-Bravo (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology* **68**:345-354.
 - Pérez-Martínez L and DM Jaworski (2005). Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal. *J Neurosci* **25**:4917-4929
 - Poulsen KT, MP Armanini, RD Kleis, MA Hynes, HS Phillips and A Rosenthal (1994). TGFβ2 and TGFβ3 are potent survival factors for midbrain dopaminergic neurons. *Neuron* **12**:1245:1252
 - Rajamannan NM, M Subramaniam, TP Abraham, VC Vasile, MJ Ackerman, DG Monroe, TL Chef, TC Spelsberg (2007). TGFbeta inducible early gene-1 (TIEG1) and cardiac hypertrophy: Discovery and characterization of a novel signaling pathway. *J Cell Biochem.* **100**:315-325
 - Roussa E, M Wiehle, N Dunker, S Becker-Katins, O Oehlke, and K Krieglstein (2006) TGFβ is required for differentiation of mouse mesencephalic progenitors into dopaminergic neurons in vitro and in vivo. Ectopic induction in dorsal mesencephalon. *Stem Cells Express.* **24**:2120-2129
 - Rozen S y HJ Skaletsky (2000). Primer3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, S Misener (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
 - Sanford LP, I Ormsby, AC Gittenberg-de Groot, H Sariolo, R Friedman, GP Boivin, EL Gardell and T Boetschman (1997). TGFb2 knockout mice have multiple

- developmental defects that are nonoverlapping with other TGF- β knockout phenotypes. *Development* **124**:2659-2670
- Schonemann MD, AK Ryan, RJ McEvelly, SM O'Connell, CA Arias, KA Kalla, P Li, PE Sawchenko and MG Rossenfeld (1995). Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2. *Genes Dev.* **9**:3122-3135
 - Segerson TP, J Kauer, HC Wolf, H Mobtaker, P Wu, IMD Jackson and RM Lechan (1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science.* **238**:78-80
 - Segre JA, C Bauer and E Fuchs (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet.* **22**:356-360.
 - Serra, R (2002) Transforming Growth Factor beta (TGF β). *Nature Encyclopedia of Life Sciences*, Londres, Nature Publishing Group. <http://www.els.net>
 - Sevarino KA, P Wu, IM Jackson IM, BA Roos, G Mandel and RH Goodman. (1988) Biosynthesis of thyrotropin-releasing hormone by a rat medullary thyroid carcinoma cell line. *J Biol Chem.* **263**:620-623.
 - Subramaniam M, SA Harris, MJ Oursler, K Rasmussen, BL Riggs, TC Spelsberg (1995a). Identification of a novel TGF-beta-regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res.* **23**:4907-4912.
 - Subramaniam M, MJ Oursler, J Rasmussen, BL Riggs y TC Spelsberg (1995b). TGF-beta regulation of nuclear proto-oncogenes and TGF-beta gene expression in normal human osteoblast-like cells. *J Cell Biochem* **57**:52-61
 - Subramaniam M, TE Hefferan, K Tau, D Peus, M Pittelkow, S Jalal, BL Riggs, P Roche and TC Spelsberg (1998). Tissue, cell type and breast cancer stage-specific expression of a TGF- β inducible early transcription factor gene. *J Cell Biochem* **68**:226-236
 - Subramaniam M, G Gorny, SA Johnsen, DG Monroe, GL Evans, DG Fraser, DJ Richard, K Rasmussen JM van Deursen, RT Turner, MJ Oursler and TC Spelsberg (2005). TIEG1 null mouse-derived osteoblasts are defective in mineralization and in support of osteoclast differentiation in vitro. *Mol Cell Biol.* **25**:1191-1199
 - Subramaniam M, JR Hawse, SA Johnsen and TC Spelsberg (2007). Role of TIEG1 in biological processes and disease states. *J Cell Biochem.* **102**:539-548
 - Tachibana I, N Imoto, PN Adjei, GJ Gores, M Subramaniam, TC Spelsberg and R Urrutia (1997). Overexpression of the TGFbeta-regulated zinc finger encoding gene, TIEG induces apoptosis in pancreatic epithelial cells. *J Clin Invest* **99**:2365-2374

- Tau KR, TE Hefferan, MK Waters, JA Robinson, M Subramaniam, BL Riggs and TC Spelsberg (1998) Estrogen regulation of a transforming Growth Factor- β Inducible Early Gene that inhibits deoxyribonucleic acid synthesis in human osteoblasts. *Endocrinology*. **139**:1346-1353
- Unsicker K, KC Flanders, DS Cissel, R Lafyatis and MB Sporn (1991). Transforming growth factor beta isoforms in the adult rat central and peripheral nervous system. *Neuroscience* **44**:603-625
- Wang W and T Lufkin (2000). The murine Otp homeobox gene plays an essential role in the specification of neuronal cell lineages in the developing hypothalamus. *Dev Biol*. **227**:432-49.
- Wotton D, RS Lo and J Massagué (1999) A Smad transcriptional corepressor. *Cell*. 97:29-39.
- Zhang JS, MC Moncreffe, J Kaczynski, E Ellenrieder, FG Prendergast and R Urrutia (2001) A conserved α -helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol Cell Biol*. **21**:5041-5049
- Zigmong MJ, FE Bloom, SC Landis, JL Roberts and LR Squire (1999) *Fundamental Neuroscience*. Academic Press.