

03062

6
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

U N A M

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE TRH EN CULTIVOS DE CELULAS
DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE
DE RATA

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA EN
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A

MA. DE LOURDES COVARRUBIAS ROBLES

1987

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	PAGINAS
I. INTRODUCCION	1
II. RESUMEN	2
III. ENFOQUE DE ESTUDIO	3
IV. ANTECEDENTES	4
1. EL SISTEMA NEUROENDOCRINO	4
2. COMUNICACION CELULAR	4
3. MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO	5
MECANISMOS DE RECEPCION DE LA SEÑAL	6
MECANISMOS DE TRANSDUCCION (PROTEINAS G)	9
AMPLIFICACION E INTEGRACION DE SEÑALES POR PROTEINAS G	10
SELECCION E INTEGRACION DE SEÑALES A TRAVES DE LA RED DE PROTEINAS G	11
MECANISMOS DE PROPAGACION DE LA SEÑAL (SEGUNDOS MENSAJEROS)	12
4. BIOSINTESIS DE NEUROPEPTIDOS	14

	PAGINAS
5. REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PEPTIDOS Y PROTEINAS	15
LA PROENCEFALINA	16
LA TIROSINA HIDROXILASA	18
LA PROOPIOMELANOCORTINA	19
LA PROLACTINA	20
6. LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH)	22
BIOSINTESIS DE LA TRH	23
FUNCIONES DE LA TRH	23
ESTUDIOS SOBRE LOS POSIBLES COMPUESTOS REGULADORES DE LA BIOSINTESIS Y LIBERACION DE LA TRH	24
V. OBJETIVOS	29

	PAGINAS
VI. MATERIALES Y METODOS	30
VII. RESULTADOS	35
1. OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE RATA	35
2. DESCRIPCION MORFOLOGICA DE LOS CULTIVOS	37
3. EXPRESION DEL RNAm DE TRH	38
4. EFECTO DE SEGUNDOS MENSAJEROS SOBRE LA BIOSINTESIS DE TRH Y SU LIBERACION EFECTO DEL 8-BROMO-AMPC SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE TRH	38
EFECTO DEL 8-BROMO-AMPC SOBRE LA CANTIDAD DE TRH INTRACELULAR Y EL TRH LIBERADO	39
VIII. DISCUSION	63
IX. BIBLIOGRAFIA	77

INTRODUCCION.

El metabolismo de los neuropéptidos es un fenómeno de gran interés ya que su conocimiento permite comprender las funciones que estas moléculas realizan dentro de los seres vivos. Cada una de las etapas involucradas en el metabolismo (biosíntesis, procesamiento, liberación e inactivación) pudiese ser regulada para controlar los niveles peptídicos que van a actuar en un tejido específico de acuerdo a los requerimientos del organismo.

En este trabajo nos hemos enfocado a estudiar un péptido particular, la hormona liberadora de tirotropina (TRH) y la etapa del metabolismo que nos ha interesado es la regulación de la biosíntesis en neuronas. Los postulados centrales son los siguientes:

¿Existen cambios en la biosíntesis de TRH, medidos como cambios en el nivel de RNAm -transcripción o estabilidad- bajo diferentes condiciones estimulatorias?

¿Cuáles son los compuestos químicos -extracelulares y/o intracelulares- que están modulando estos cambios?

¿Hay un acoplamiento de la biosíntesis con la liberación del péptido?

¿Se podría postular un mecanismo intracelular por lo que los diversos reguladores de la biosíntesis en la neurona TRHérgica están actuando?

Para abordar estas cuestiones, hemos elegido un sistema in vitro que nos proporciona ciertas características para cumplir con los requisitos del trabajo. Este sistema es el cultivo primario de células dispersas que posee las siguientes propiedades fundamentales:

(1) Es un sistema aislado cuya organización celular no es tan compleja (como un sistema in vivo) y nos permite interpretar los resultados de una manera relativamente fácil.

(2) Es posible mantener al sistema por tiempos prolongados de tal modo que podemos manipular las condiciones experimentales de acuerdo a las exigencias particulares de cada uno de los propósitos por efectuar.

(3) Es posible observar directamente a las células (neurona, glia) bajo condiciones normales y experimentales, y examinar si existe alguna alteración morfológica durante el desarrollo experimental.

RESUMEN.

Un gran número de neuropéptidos y neurotransmisores estimulan a las células neuronales a través de segundos mensajeros. Con la finalidad de estudiar si la biosíntesis de TRH se ve regulada por estos mediadores intracelulares, se optimizó un cultivo primario de células dispersas de hipotálamo de rata, el cual presentó las condiciones necesarias para abordar el problema. Se probó un análogo del segundo mensajero AMPc, el 8-bromo-AMPc y un activador de la adenilato ciclasa, la forskolina. Los resultados indicaron que el AMPc y la forskolina ocasionaron un aumento en los niveles de RNAm de TRH. Este último apoyando el efecto del 8-bromo-AMPc sobre la vía de dicho mediador intracelular. También se determinó que el AMPc ocasionó una disminución en la TRH intracelular y un incremento en el péptido liberado. En conjunto, los resultados con AMPc sugirieron un acoplamiento entre la biosíntesis y la liberación de la TRH. Se concluye que tenemos las primeras evidencias de la regulación de la neurona TRHérgica por AMPc (tanto en su biosíntesis como en su liberación).

ENFOQUE DE ESTUDIO.

Todas las sustancias químicas encontradas en los seres vivientes se localizan en cantidades definidas para que se realicen adecuadamente sus funciones dentro del organismo.

Es necesario que se lleve a cabo un proceso que determine cuál será la cantidad de compuesto químico que se presente bajo ciertas condiciones fisiológicas. A este proceso se le conoce como regulación, la cual puede llevarse a cabo en diferentes niveles en una célula única: síntesis, compartimentalización, procesamiento, liberación y/o inactivación.

Los mecanismos intracelulares para que se efectúe dicha regulación son muy variados y dependientes, mas que de la sustancia química por estudiar, del tejido en que se encuentre y de su contexto fisiológico dentro del organismo.

Para poder entender la regulación, en principio, se puede considerar a la célula como una entidad aislada que puede responder a la información que recibe del exterior. Esta célula es capaz de traducir dicha información a su interior de tal modo que pueda modular cada uno de sus procesos intracelulares (p. ej. biosíntesis, liberación).

Aquí me enfocaré a un sistema en particular, el sistema neuroendócrino, el cual está involucrado en gran cantidad de funciones importantes para la sobrevivencia de los seres vivos y haré resaltar los mecanismos intracelulares por medio de los cuales un determinado tipo celular traduce las señales que recibe del exterior para definir la cantidad de compuesto químico que debe ser liberado.

ANTECEDENTES.

El sistema neuroendócrino está involucrado en gran cantidad de funciones importantes para la sobrevivencia de los seres vivos. Este sistema recibe señales tanto del medio exterior como del interior, y su papel central es mantener constante el ambiente interno en el organismo por medio de un mecanismo denominado homeostasis (Kupfermann, I. 1982).

El hipotálamo es la región del cerebro responsable de los mecanismos homeostáticos (Kupfermann, I. 1982). Está conformado por un gran número de células nerviosas (agrupadas en núcleos) las cuales presentan interconexiones entre sí y con diversas regiones del sistema nervioso central. El hipotálamo controla las influencias externas e internas, por interconexión no sólo con áreas del sistema nervioso central sino también del sistema endócrino, traduciendo los estímulos (neurales u hormonales) para una respuesta fisiológica adecuada (Kupfermann, I. 1982).

Una de las funciones centrales del hipotálamo es controlar la glándula pituitaria (Green y Harris, 1947). El hipotálamo se encuentra en posición dorsal a la glándula y las células que lo conforman envían sus terminales a un plexo capilar situado a nivel de la eminencia media en donde se liberan las sustancias producidas en él. Estas sustancias una vez liberadas viajan por un sistema vascular portal hasta la hipófisis donde provocan la liberación de las hormonas hipofisiarias las cuales son transportadas por el torrente sanguíneo para actuar sobre la célula blanco específica y efectuar su función o funciones dentro del organismo (FIGURA 1.1).

COMUNICACION CELULAR

En el sistema neuroendócrino existe una comunicación intercelular. Hay dos tipos primarios de comunicación: de tipo nervioso y de tipo hormonal. El sistema de comunicación de tipo nervioso envía su mensaje (a través de mensajeros químicos) a un conjunto específico de células blanco utilizando sitios específicos conocidos como sinapsis. El sistema de comunicación hormonal generalmente es menos directa y la forma más

Sistema Hipotálamo-Neurohipófisis

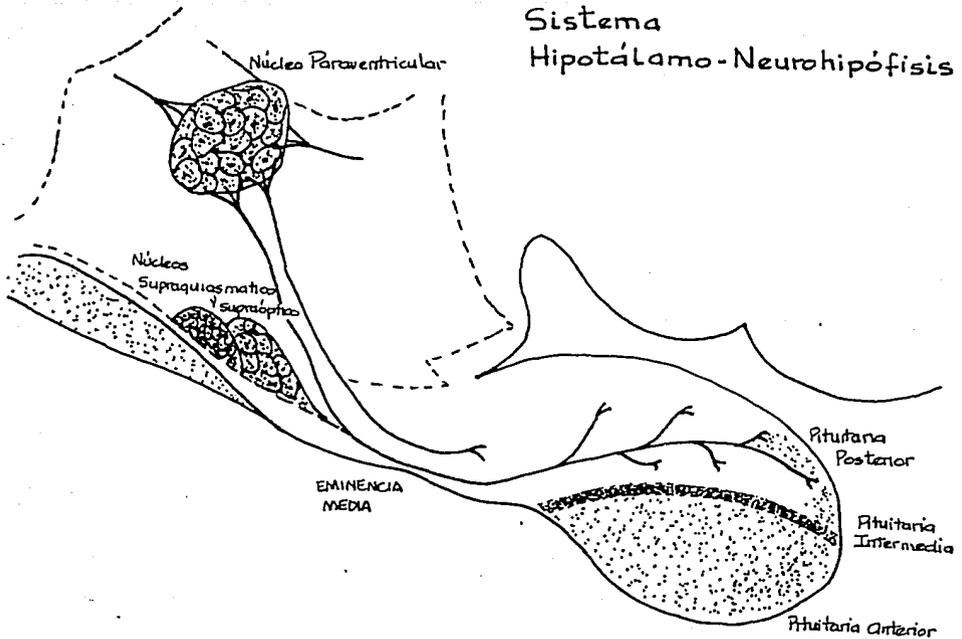


Figura 1.1

FIGURA 1.1. SISTEMA HIPOTALAMO-NEUROHIPOFISIS.

Neuronas Magnocelulares en el núcleo supraóptico y paraventricular envían sus axones a la pituitaria posterior via la eminencia media. (Tomado de Brownstein, M.J. et.al. Science. 207: 373 (1980).

común se encuentra en el sistema endócrino donde las glándulas liberan hormonas que viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar a actuar sobre la célula blanco específica. Dentro de la acción hormonal se encuentran los mecanismos autócrinos y parácrinos en donde la hormona actúa sobre la célula que la libera o en una célula adyacente, respectivamente (Snyder, S.H. 1985).

Las sustancias químicas que son liberadas por las células que integran el sistema neuroendócrino son: los neurotransmisores clásicos que consisten en aminoácidos o derivados de éstos; p. ejemplo, glicina o los más comunes, la acetilcolina, el ácido gamma-aminobutírico (GABA), las catecolaminas (noradrenalina, adrenalina) así como la nueva familia de neuropéptidos. Entre éstos últimos se encuentra p.ej. la somatostatina, la hormona que libera tirotrópina (TRH), la met-enkefalina, la oxitocina, la vasopresina -por citar algunos-; dichos neuropéptidos pueden actuar como neurotransmisores o neuromoduladores de la señal nerviosa, o bien como hormonas. Es posible encontrar ambos tipos de sustancias neurotransmisoras compartiendo una célula única teniendo el caso de la somatostatina y norepinefrina en neuronas simpáticas de rata (Spiegel 1989), met-enkefalina y GABA en estriado de rata (Sivam et.al. 1986) ó péptidos opioides y catecolaminas en médula suprarrenal (La Gamma et.al. 1989). En algunos casos, una de las sustancias coexistentes funciona como modulador de la otra para que la respuesta sea adecuada.

MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES EN EL SISTEMA NEUROENDOCRINO.

El sistema neuroendócrino recibe información del exterior e interior al organismo para regular con propiedad las funciones en las que está involucrado: recibe señales de tipo físico y/o químico que determinan la cantidad de neurotransmisor (y/o neuromodulador) liberado para actuar en la célula blanco específica.

Para que una célula pueda responder a un estímulo exterior necesita de lo siguiente:

(1) Que el estímulo exterior o señal (por ejemplo, un neurotransmisor o una hormona) encuentre un receptor específico y exista un acoplamiento entre ambos (p.ej. dopamina-receptor extramembranal u hormona tiroidea-receptor citosólico).

(2) En el caso del estímulo exterior con receptor membranal, que el receptor esté acoplado a un sistema de transducción de la señal, siendo éste las proteínas G (Ross 1989 y Dolphin, 1987). En el caso del estímulo exterior con receptor citosólico (como son las hormonas tiroideas o los esteroides), éstas acopladas a su receptor, viajan directamente hacia el núcleo donde se pueden unir a la secuencia nucleotídica del DNA y provocar un efecto determinado. Este último caso no será descrito.

(3) La señal (o estímulo exterior), que se transduce por las proteínas G, se propaga al interior de la célula a través de los segundos mensajeros, siendo los más conocidos: el AMPC (Pastan, 1972), el inositol trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (ruta de fosfoinosítidos) (Berridge, 1984, 1987), el GMPC (Naor, 1990), el Ca^{++} (Kennedy, 1989), derivados del ácido araquidónico (Shimizu, 1990).

(4) Los segundos mensajeros activan las proteínas cinasas específicas que fosforilan ciertas proteínas (en la mayoría de los casos desconocidas) (Greengard, 1987; Nishizuka, 1986). Estas proteínas pueden desencadenar varios procesos metabólicos intracelulares:

-por ejemplo pueden activar una vía que da lugar a que ciertas proteínas se unan a una región específica de la secuencia nucleotídica del DNA para activar o reprimir la transcripción de un gene (regularían la biosíntesis de un determinado neurotransmisor).

-pueden actuar sobre el procesamiento de una proteína específica (p.ej. modulando la velocidad de síntesis de un neuropéptido).

-pueden activar la liberación de una sustancia transmisora a través de la apertura de canales iónicos (Strong, 1987; Hescheler, 1987; Dunlap, 1987).

1. MECANISMOS DE RECEPCION DE LA SEÑAL

Para que una célula responda a múltiples señales extracelulares (p.ej. hormonas, neurotransmisores) necesita de receptores específicos.

Los receptores de superficie celular que actúan vía las proteínas G están constituidos de una familia de glicoproteínas integrales de la membrana plasmática. El conocimiento de su estructura se ha apoyado en estudios biofísicos y bioquímicos de rodopsina (Findlay, 1986) y sobre análisis genéticos recientes de

aproximadamente 15 subtipos de receptores alfa y beta adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos, muscarínicos, colinérgicos y peptidérgicos (Libert et.al., 1989, Parmentier et.al., 1989). Todos se caracterizan por poseer siete extensiones hidrofóbicas transmembranales, sitios consenso para glicosilación amino-unida cerca del amino-terminal, tres asas cortas extracelulares, 2 asas cortas citoplásmicas y catiónicas y una asa citoplásmica más larga que conecta las extensiones cinco y seis (Ross, 1989). La región amino terminal es extracelular y la porción carboxilo-terminal constituye las siete extensiones hidrofóbicas transmembranales. Con la finalidad de comprender cómo se lleva a cabo la transducción de señales una vez que el ligando (u agonista) se ha unido al receptor, es importante tener presente que en su estructura deben existir dos sitios (o dominios funcionales) fundamentales los cuales son estructuralmente diferentes en esta familia de receptores. Estos sitios son aquéllos que proveen selectividad a los ligandos y a las proteínas G (p.ej. Gs o Gi). Estudios genéticos por mutagénesis dirigida de la rodopsina y el receptor beta adrenérgico, apoyados por trabajos comparativos partiendo de la clonación de algunos receptores (p.ej. dopamina, tirotropina) y el análisis estructural y funcional, (Parmentier, et.al. 1989; Albert, et.al. 1990), han provisto de las siguientes generalizaciones:

Los receptores que se acoplan a proteínas G se pueden categorizar en dos grupos. El primero lo constituyen los receptores de la familia de la rodopsina, los beta-adrenérgicos, los muscarínicos y algunos péptidos (la sustancia K); en estos casos, los neurotransmisores u hormonas se unen al receptor en un centro hidrofóbico formado por las extensiones (o haces de hélices) transmembranales, aunque es probable la contribución de extensiones de membrana individuales. Esto se apoya por el uso de ligandos de fotoafinidad que marcan los centros hidrofóbicos de un receptor beta-adrenérgico y un receptor colinérgico muscarínico así como datos obtenidos utilizando receptores químéricos (Kobilka, et.al., 1988). También se ha identificado, para este grupo de agonistas,

el otro dominio funcional importante (el de acoplamiento con la proteína G, Gs o Gi) y se ha definido por estudios de delección o tratamiento con proteasas (Rubenstein, 1988) qué dominios del lado citoplásmico catiónico del receptor están implicados en regular la proteína G; estos estudios, junto con aquéllos hechos con receptores quiméricos, sugieren que el asa citoplásmica grande que conecta las extensiones de membrana 5 y 6 puede ser un componente principal del dominio que une a estas proteínas (Kobilka, et.al., 1988).

El segundo grupo lo constituyen los receptores de la familia de las hormonas glicoproteicas, entre las que se encuentra la tirotropina (TSH), la hormona que estimula los folículos (FSH) y la hormona coriogonadotrópica (hCG). Estas presentan una subunidad alfa común y una subunidad beta que confiere la especificidad de unión al receptor (Parmentier, et.al. 1989; Loosfelt, et.al 1989). Dichos receptores, a diferencia del grupo anterior, presentan un dominio extracelular hidrofílico grande localizado en la región amino-terminal, el cual constituye el sitio de unión a un ligando de tamaño grande (a diferencia también del grupo anterior); es posible que dicho dominio interactúe con los sitios transmembranales para mediar la transducción de señales. El sitio de unión a las proteínas G (Gs o Gi) esta conformado por un sitio que atraviesa la extensiones 6 y 7 localizadas en el carboxilo terminal y la tercera asa citoplásmica (Loosfelt, et.al. 1989).

La clonación de diferentes tipos de receptores como el de dopamina D2 (Albert, 1990), el de tirotropina (Parmentier, 1989) y el de la hormona coriogonadotrópica (McFarland, et.al., 1989) han permitido realizar estudios de transfección del DNAC a diferentes tipos celulares y observar que dichos receptores activan las proteínas G ocasionando la generación de un segundo mensajero (p.ej. AMPc), y una respuesta fisiológica determinada (p.ej. la estimulación o inhibición de la secreción de prolactina en el caso del receptor de dopamina D2) (Albert, 1990).

Se ha descrito de manera general las características estructurales y funcionales de la familia de receptores que se acoplan a proteínas G encargados de transducir las señales al interior de una célula. Una vez que el agonista se une al receptor éste debe sufrir ciertas modificaciones estructurales que le permitan desencadenar la maquinaria de transducción: parece que un agonista distorsiona el sitio de unión ligeramente para modificar

las terminales citoplásmicas de las extensiones transmembranales lo suficiente como para convertir el dominio citoplásmico (o sitio de unión a las proteínas G) en una conformación regulatoria que permita activar los componentes de las proteínas G (esto es, catalizar el intercambio nucleotídico sobre esta proteína) -como se vera en la siguiente sección-.

MECANISMOS DE TRANSDUCCION (PROTEINAS G).

El sistema de transducción de señales es complejo. Está regulado fundamentalmente por las denominadas proteínas G (debido a su unión al nucleótido, GTP) y en general, consiste de una serie de modificaciones estructurales de dicha proteína membranal con los componentes de la maquinaria. Los componentes son: el receptor, las proteínas G y las moléculas efectoras. La función esencial de este sistema es integrar y amplificar las señales (o estímulos) que recibe una determinada célula.

Las proteínas G son proteínas que unen GTP y están constituidas de 3 subunidades: la alfa, la beta y la gama. La unión del agonista a su receptor ocasiona que la proteína G se disocie y la subunidad alfa intercambie GDP por GTP activando la molécula o las moléculas efectoras; estas últimas pueden ser: la fosfolipasa C, la fosfolipasa A2, la adenilil ciclasa. Dichas moléculas se activan dependiendo del tejido (o célula) en que se encuentre o del agonista que se una a un receptor específico.

El mecanismo de transducción de señales ocurre de la siguiente manera:

1o. Antes de que el ligando u agonista se una al receptor los componentes del sistema se encuentran en la siguiente conformación: el receptor está acoplado a la proteína G

(las subunidades alfa, beta y gama) el cual se encuentra unido a GDP -estado inactivo-. Este estado ocasiona un incremento en la afinidad del receptor por el agonista.

2o. Una vez que el agonista se une al receptor, la subunidad alfa se disocia del dímero beta-gama, lo que ocasiona el intercambio nucleotídico GDP por GTP transformando el complejo de estado inactivo a estado activo.

3o. La unión de GTP a la subunidad alfa causa su activación y le permite asociarse con proteínas efectoras (la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa; la fosfolipasa C; grupo de canales de Ca⁺⁺, grupo de canales de K⁺ y la fosfolipasa A2).

40. Esto último ocasiona que el receptor pase de su estado de alta afinidad por el agonista a un estado de baja afinidad. La subunidad alfa acoplada a GTP posee actividad de GTPasa desactivándose cuando hidroliza GTP. De este modo, queda otra vez la subunidad alfa en estado inactivo (con GDP), lista para que se una otro agonista al receptor y se inicie nuevamente el proceso de transducción.

En cuanto a la subunidad beta-gama tiene varias actividades:

- La subunidad beta-gama inhibe la actividad de la subunidad alfa por GTP; esto es, estabiliza la unión de la subunidad alfa por el receptor anclando su porción relativamente hidrofílica a la membrana plasmática y, por lo tanto, estabilizando el enlace de GDP. Esto parece ser importante para la inhibición de las proteínas G mediadas por receptor. La inhibición de la unión de GTP a las subunidades alfa por beta-gama son recíprocas: la activación de proteínas G por GTP causa la disociación de beta-gama, incrementando la concentración de subunidades beta-gama libres en la membrana. Esta inhibición recíproca provee un mecanismo bioquímico para la inhibición hormonal de la señal mediada por proteínas G. Katada (1984) puntualiza que la liberación de beta-gama por una proteína G inhibe la activación de las otras proteínas en la membrana plasmática y sugiere que la liberación de beta-gama de G_i es el mecanismo por el que receptores acoplados a G_i causan la inhibición de adenilato ciclasa.

- Se ha propuesto otra posible función de beta-gama. En algunos sistemas las subunidades beta-gama que son liberadas cuando la estructura trimérica se disocia (o activa) también pueden ser señales a efectores. Parece que la actividad de fosfolipasa A2 se puede estimular por la subunidad beta-gama (y, no la subunidad alfa) de la proteína G (G_t) en los segmentos exteriores de los conos de las células en la retina (Jelsema y Axelrod, 1987). También Kurachi (1989) argumentó que las subunidades beta-gama pueden activar una fosfolipasa A2 en el corazón y señaló que este efecto estimulador de la subunidad necesita estudios adicionales.

AMPLIFICACION E INTEGRACION DE SEÑALES POR PROTEINAS G.

Las proteínas G son responsables de amplificar las señales y entonces dirigir las a los efectores apropiados; conforman las bases

de una red de procesamiento de información compleja en la membrana plasmática siendo su papel principal organizar las señales que reciben de múltiples receptores y dirigirlos a un arreglo apropiado de efectores. Los circuitos son comunes y las señales (inhibitorias o estimulatorias) de receptores diferentes pueden integrarse a través de una o más proteínas G para estimular una única ruta de segundos mensajeros.

Para que suceda la amplificación de señales se han hipotetizado algunos mecanismos:

El intercambio GDP/GTP es suficientemente rápido de tal modo que un receptor puede mantener la activación de múltiples moléculas de la proteína G. Además, para simplemente amplificar la señal, el potencial catalítico del receptor aumenta la sensibilidad del sistema a bajas concentraciones de agonista; aún en concentraciones saturantes los receptores, acoplados a proteínas G, pueden frecuentemente producir cerca de la activación total de sus efectores. El GTP facilita la liberación del receptor de la proteína G activada, permitiendo que un receptor pueda servir a muchas proteínas G secuencialmente (Ross y Gilman, 1980; Ross, 1989)

SELECCION E INTEGRACION DE SEÑALES A TRAVES DE LA RED DE PROTEINAS G.

La notable ventaja de las proteínas G como transductores es su capacidad para dirigir señales exteriores de receptores múltiples a diferentes rutas de segundos mensajeros citoplásmicos. Integración. Se ha demostrado que receptores para múltiples hormonas activan una poza común de la adenilato ciclasa. Es claro que estos receptores regulan Gs la cual integra y lleva sus señales a la ciclasa.

Aunque un receptor genera una respuesta fisiológica característica, un único receptor puede generar múltiples salidas

de segundos mensajeros. Para dirigir una señal entrante en varias direcciones simultáneamente, las células utilizan lo que se denomina acoplamiento divergente; esto es, mientras existe el acoplamiento proteína G-receptor, existen las interfases proteína G-efectores.

MECANISMOS DE PROPAGACION DE LA SEÑAL.

(Segundos Mensajeros).

Para la descripción de los segundos mensajeros y la cascada de transducción y propagación de la señal, ver FIGURA 1.2.

Después que las moléculas efectoras (adenilil ciclase, fosfolipasa C, fosfolipasa A2) se han activado por medio de las proteínas G, se desencadenan las diferentes rutas de propagación de una señal. Esta propagación se hace a través de los segundos mensajeros.

El primer sistema de segundos mensajeros estudiado fue el AMPc, el cual se forma a partir de ATP por la activación de adenilil ciclase (Pastan, 1972). Se sabe que este propagador activa una proteína cinasa específica, la proteína cinasa A (proteína cinasa dependiente de AMPc) la cual se encarga de la fosforilación de diversas proteínas intracelulares (Insel, 1975; Simantov, 1975) como la proteína básica (de 23kd) conocida como BRP (Murdoch, 1982), que en su forma fosforilada activa la transcripción del gene de prolactina por la TRH (Murdoch, et.al. 1983), ó la proteína nuclear básica (CBP) de 19 kd localizada en células GH4 (Waterman, et.al., 1985). Estos ejemplos constituyen casos de una acción directa de las proteínas cinasas dependiente de AMPc sobre la regulación de la transcripción de un gene. Otras proteínas que se fosforilan por la proteína cinasa A también pueden ser canales iónicos involucrados en la secreción de sustancias químicas neurotransmisoras (Yatani, et.al. 1988)

Otro sistema de propagación conocido es el de fosfatidilinositol el cual se activa por la fosfolipasa C formando fosfatidilinositol trifosfato y diacilglicerol. El fosfatidilinositol trifosfato (IP3) ocasiona la liberación de Ca^{++} intracelular del retículo endoplásmico rugoso (RER) y, puede

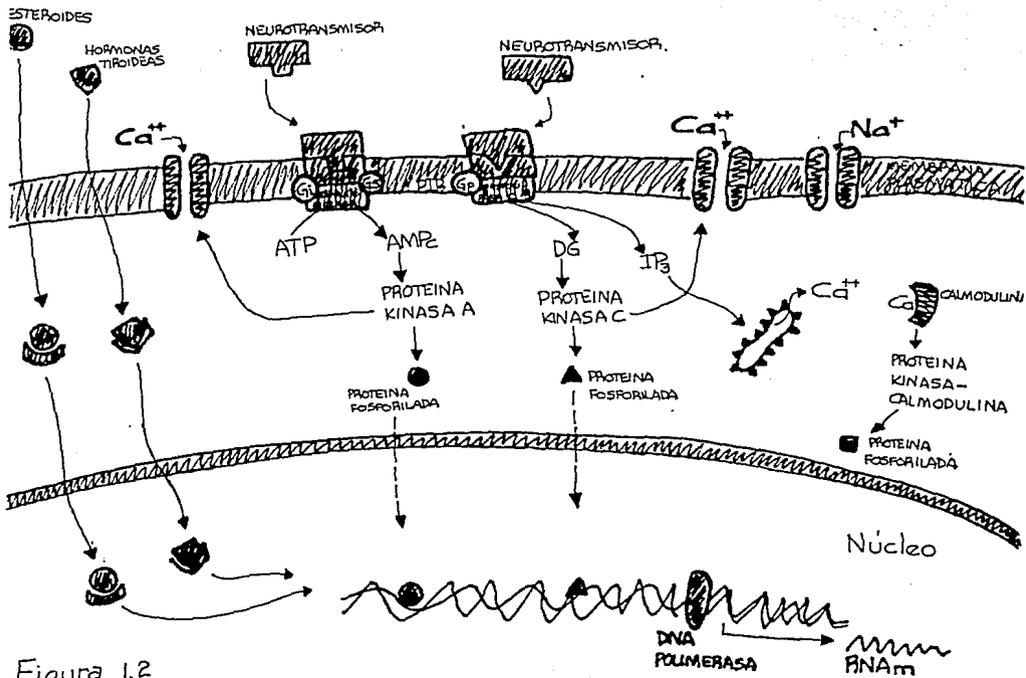


Figura 1.2

FIGURA 1.2. MECANISMOS DE TRANSDUCCION Y PROPAGACION DE LA SEÑAL.

tener diferentes funciones ya sea uniéndose a la proteína calmodulina y activando las proteínas cinasas dependientes de calmodulina (por ejemplo, la proteína cinasa, pKI y pKII) (Kennedy, 1989) las cuales se ha demostrado que fosforilan diversas proteínas siendo algunas de éstas, las proteínas Fos y Jun (Morgan y Curran, 1989). Estas últimas pudiesen estar involucradas en la modulación de la transcripción de diferentes genes (Sonnenberg, et.al. 1989).

El diacilglicerol activa la proteína cinasa C. En este caso es menos clara la identidad de sustratos proteicos específicos. Se ha propuesto a una proteína de membrana, la B50 cuya forma fosforilada inhibe la conversión de PIP (fosfatidilinositol monofosfato) a PIP2 (fosfatidilinositol difosfato) (Huang, 1989).

El Ca^{++} es otro segundo mensajero cuando se incrementa su concentración intracelular por medio de IP3 o a través de canales de Ca^{++} . Este aumento de Ca^{++} puede ser modulado por la proteína cinasa A o la C al fosforilar canales de Ca^{++} (en algunos casos dependientes de voltaje) o, a través de proteínas G acopladas al canal (Chad, et.al. 1986; Kaczmaek, et.al, 1987).

Cada una de las respuestas mediadoras pueden estar interactuando y modulándose entre si; se sabe que la proteína cinasa II dependiente de calmodulinas puede desactivar la fosfodiesterasa, enzima encargada de desfosforilar una proteína activada por la proteína cinasa A (Huang, 1989).

Dentro de la cascada de propagación de la señal se encuentra la activación de los ahora denominados terceros mensajeros (Morgan y Curran, 1989). Estos son los proto-oncogenes (como c-fos y c-jun) y cada uno de ellos puede ser activado por los segundos mensajeros. Es conocido que c-fos y c-jun son activados por el AMPc y la proteína cinasa C pudiendo formar heterodímeros u homodímeros cuyo complejo conforma AP1. Este complejo proteico tiene la propiedad de reconocer una secuencia nucleotídica específica en un gene para activar o reprimir su transcripción (Curran y Roberts, 1988). Existen otras proteínas activadas por los segundos mensajeros y que regulan la expresión génica: AP2 y AP4 las cuales son activadas por la proteína cinasa C y AMPc (Imagawa, et.al., 1987). Algunas de estas proteínas parecen también ser activadas por Ca^{++} (Morgan, et.al. 1986; 1988).

Recapitulando, los mecanismo de transducción de señales implican los siguientes componentes:

- un mecanismo de recepción de la señal
- un mecanismo de transducción localizado en la membrana citoplásmica (proteínas G)
- efectores responsables de la propagación de la señal (los segundos mensajeros).

La célula responderá a la señal ya sea a nivel biosintético, en la liberación y/o en la degradación de la sustancia o sustancias afectadas.

Hasta aquí se ha descrito como se traduce una señal al interior de la célula lo cual afecta diversos procesos metabólicos. Ya que los fines de este trabajo recaen sobre la regulación de la biosíntesis de los neuropéptidos, la siguiente sección se refiere a esta etapa del metabolismo celular y cómo es regulada por diferentes señales (intra y/o extracelulares)

BIOSINTESIS DE NEUROPEPTIDOS.

La biosíntesis de los neuropéptidos se lleva a cabo en el soma neuronal por un mecanismo dependiente de ribosomas. La síntesis produce una proteína de peso molecular grande que es procesada enzimáticamente hasta producir un péptido (o péptidos) maduros los cuales son biológicamente activos (Mains y Eipper, 1983; Sossin, et.al., 1989).

La proteína se sintetiza como una pre-proteína que se caracteriza por poseer una secuencia señal que consta entre 20 y 30 residuos de aminoácidos (Dautry-Varsat, 1983; Docherty y Steiner, 1982; Walter y Blobel, 1983) . Esta secuencia señal le permite a la cadena polipeptídica transportarse vectorialmente al lumen de retículo endoplásmico rugoso (RER) donde se llevan a cabo una serie de modificaciones co- y post-traduccionales. La primera modificación es el corte de la secuencia señal por una enzima poco caracterizada que se conoce como una zinc metaloendopeptidasa microsomal (Mumford, 1980). Este corte da lugar al pro-péptido el cual sufre una serie de modificaciones post-traduccionales que hacen que dicha molécula se provea de marcadores específicos para ser seleccionada como proteína de secreción. Las modificaciones

iniciales se efectúan por medio de la adición de un oligosacárido enlazado a asparagina al péptido naciente. Este oligosacárido es el precursor de oligosacáridos amino-unidos que contienen un número determinado de moléculas de manosa. Los oligosacáridos en proteínas maduras contienen de cinco a ocho manosas y 2-N-acetilglucosaminas; el complejo contiene ácido siálico, galactosa y N-acetilglucosamina. Este complejo varía en el número de ramificaciones (de 2 a 4) y el número de residuos siálicos lo que da las características básicas para que el pro-péptido sea seleccionado a una proteína de secreción, nerviosa y endócrina (Dautry-Varvat, 1983).

Modificadas las proteínas, éstas viajan hasta el aparato de Golgi en donde se integran en vesículas. Dentro de las vesículas, sufren otras modificaciones post-traduccionales como fosforilación, acetilación, sulfatación (Huttner, 1988; Eipper y Mains, 1982) y una modificación importante que es el procesamiento enzimático de la pro-forma. Este procesamiento se lleva cabo por medio de enzimas (tipo serina, metalo y/o tiol-proteasas) que reconocen generalmente residuos de diaminoácidos básicos (arginina-arginina, arginina-lisina, lisina-lisina, lisina-arginina), aunque sitios mono(Arg-), tri- y tetra-básicos son también reconocidos. La conformación de la secuencia proteica puede ser importante para determinar el sitio de corte; se ha observado que el corte requiere residuos básicos situados en, o aledaños a, las hélices beta de la secuencia proteica (Rholam, M, et.al. 1986). Todas las formas precursoras neuropeptídicas conocidas contienen estas secuencias de residuos básicos flanqueando la secuencia de péptidos activos. Los aminoácidos básicos son posteriormente cortados por otras enzimas del tipo de la carboxipeptidasa H (Hook, 1988).

Este procesamiento enzimático se lleva a cabo en los gránulos de secreción, existiendo ejemplos que muestran que puede iniciarse en el trans Golgi (Lepage, et.al. 1991) y prosiguiendo a lo largo del axón (durante el transporte de las vesículas) hasta llegar a la terminal nerviosa donde las proteínas se encuentran en su forma madura, biológicamente activas, listas para ser liberadas y actuar en la célula blanco específica (FIGURA 1.3)

REGULACION DE LA BIOSINTESIS DE PEPTIDOS Y PROTEINAS.

En los últimos años se ha estudiado cómo se regula la biosíntesis y la liberación de las diferentes sustancias relacionadas con la transmisión nerviosa.

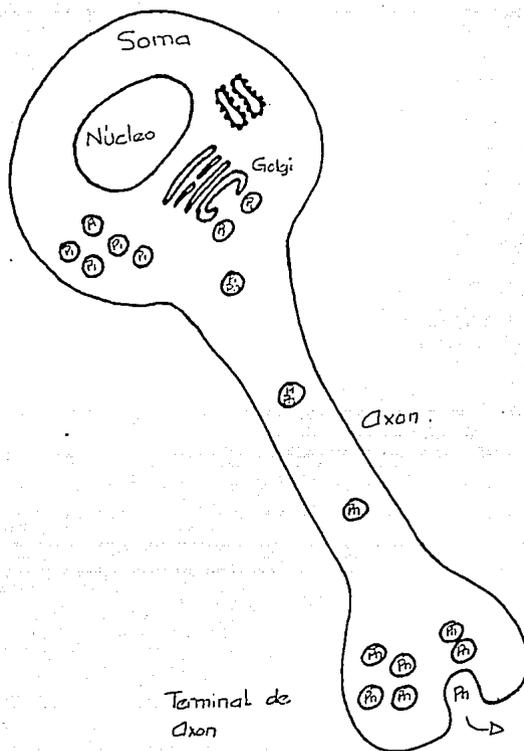


Figura 1.3

FIGURA 1.3. BIOSINTESIS, TRANSLOCACION, PROCESAMIENTO Y LIBERACION DE PEPTIDOS.

La translocación del RNAm ocurre en el retículo endoplásmico (RER) produciendo un propéptido o proteína precursora (P1) en el espacio cisternal del retículo endoplásmico. El empaquetamiento de P1 ocurre en el aparato de Golgi. El gránulo secretorio es el sitio de procesamiento posttraduccional a productos peptídicos más pequeños (P1...Pn) que puede ocurrir en el cuerpo celular o en el axón durante el transporte axonal. El contenido granular se libera (exocitosis) cuando las terminales nerviosas se despolarizan (Tomado de Brownstein, M.J. et.al. Science 207: 373 (1980)).

Los diversos enfoques han considerado el uso de mediadores intracelulares encargados de definir una respuesta específica en cierto modelo de estudio (p.ej. cultivos primarios, líneas celulares -sistemas in vitro- o modelos en el animal completo -sistemas in vivo-). La regulación del metabolismo celular se da se puede dar en todas las etapas metabólicas de cierto compuesto químico (ya sea un neuropéptido o una proteína).

La finalidad última de estos estudios es comprender, bajo un contexto fisiológico, cómo un grupo neuronal define la cantidad de neurotransmisor que debe ser liberado.

Algunos ejemplos representativos de regulación de neuropéptidos y proteínas son los siguientes:

1) LA PROENCEFALINA.

La proencefalina es el precursor -proteína de 29000 d- de los péptidos met-enkefalina y leu-enkefalina. Se encuentra principalmente en médula adrenal (Siegel, et.al. 1985) aunque se ha localizado en regiones del sistema nervioso central como es el estriado (Sivam y Hong, 1986), el caudado-putamen (Morris, et.al. 1988) y el hipocampo (Romano, et.al. 1987).

El conocimiento que se tiene alrededor de la célula proencefalínérgica recae no sólo sobre su biosíntesis sino también sobre cómo se ve regulada la liberación del péptido.

Esta información puede agruparse en estudios que han utilizado regiones específicas del sistema nervioso central (p.ej. las ya citadas) o en la médula suprarrenal (proveyendo un conocimiento de mayor profundidad en una región localizada y en donde la familia de las enkefalinas tiene una función definida).

Se sabe que los niveles de RNAm de proencefalinas se incrementan por el efecto de diversos neurotransmisores cuyas vías llegan a regiones del sistema nervioso central. En estriado, el GABA (Sivam, et.al. 1986) es un regulador de la respuesta de las células enkefalínérgicas y causa un incremento en los niveles de

RNAM así como en el propéptido (proteína), pero no tiene efecto sobre el péptido maduro, met-enkefalina. La explicación a este fenómeno es que existe una liberación incrementada de la met-enkefalina por lo que la biosíntesis (posiblemente la transcripción) se incrementa; sin embargo, la velocidad de liberación es mayor que la biosíntesis por lo que no se observa incremento en el péptido maduro (intracelular). En caudado-putamen se ha observado que la dopamina ocasiona un incremento en los niveles de RNAm (Morris, et.al., 1988).

Se conocen los siguientes trabajos sobre los mediadores intracelulares acoplados a un receptor que están regulando a la célula encefalinérgica. Utilizando una línea celular de glía (glioma C6), Yoshikawa et.al. (1986) demuestran que la noradrenalina incrementa los niveles del RNAm de proenkefalina y que este incremento es mimetizado por el 8-bromo-AMPC -análogo del AMPc-. Un dato interesante es que el efecto que tiene el segundo mensajero se ve potenciado por el glucocorticoide sintético, dexametasona. Los resultados indican un incremento en la cantidad de proteína precursora pero no en el péptido procesado, met-enkefalina (este fenómeno también se observa en el estudio hecho en estriado -Sivam, et.al., 1986). Otro trabajo sugiere que el receptor de histamina H1, acoplado a la hidrólisis de fosfoinosítidos, ocasiona un incremento en el RNAm encefalinérgico en células cromafines adrenales de bovino (Kley, et.al. 1987).

Estas observaciones han ayudado a aclarar cómo en una diversidad de tejidos hay un receptor que, acoplado a un sistema de segundos mensajeros, da una respuesta en la célula encefalinérgica. Una vía como la del AMP cíclico (vía a través de un receptor) puede estar interactuando con otros mediadores intracelulares como Ca^{++} o glucocorticoides (Kley, et.al. 1987; Yoshikawa, et.al. 1986).

En cultivos (primarios y explantes) de médula suprarrenal, Siegel et.al. (1985), La Gamma et.al. (1985), Kley et.al. (1986) han estudiado si la despolarización, producida por K^{+} 56.0mM y veratridina, modula el metabolismo de la célula encefalinérgica y han estudiado si el Ca^{++} juega un papel fundamental. Dichos estudios se han hecho en bovinos y ratas ya que la respuesta varía dependiendo de la especie. En la rata, K^{+} a altas concentraciones disminuye los niveles de RNAm de proenkefalina así como el péptido leu-enkefalina, postulándose que el nervio esplácnico que llega a médula suprarrenal libera un neurotransmisor

inhibitorio, por lo que al extraer la médula se efectúa una denervación que incrementa los niveles de RNAm y al despolarizar se simulan los efectos del neurotransmisor. En contraste, los trabajos en células cromafines de bovino indican que la despolarización (producida por K^+ 56mM) incrementan tanto los niveles de RNAm como del péptido met-enkefalina, y que este incremento esta mediado por Ca^{++} extracelular (involucrando a canales de Ca^{++} dependientes de voltaje) y Na^+ (como se demuestra al bloquear la respuesta con tetrodotoxina).

Este conjunto de resultados sobre la regulación de la célula encefalinérgica en médula adrenal (explantes y cultivos) apoyan la existencia de diferentes receptores (p.ejemplo dopamina, histamina) en un mismo tipo celular, por lo que cabe postular que una respuesta determinada puede ser regulada por diferentes efectores y bajo condiciones fisiológicas diferentes.

2) LA TIROSINA HIDROXILASA.

Otras proteínas estudiadas que me parece apropiado describir, son las enzimas que intervienen en la biosíntesis de catecolaminas, principalmente, la tirosina hidroxilasa.

Esta enzima se ha localizado en médula suprarrenal y en regiones del sistema nervioso central, como el locus coeruleus noradrenérgico y la sustancia nigra dopaminérgica (Faucon, et.al. 1986; Friedman, et.al. 1988).

Los estudios alrededor de tirosina hidroxilasa se iniciaron al observar que su actividad se afectaba por estímulos despolarizantes o con análogos de segundos mensajeros (Garber, et.al. 1987; Joh, et.al. 1973). Se estudió si ésto era debido a un incremento en la transcripción (biosíntesis). Los niveles de RNAm de tirosina hidroxilasa se incrementan utilizando los análogos de AMPc y dexametasona (Lewis, et.al. 1983; Lewis, 1987); estudios que apoyan estos efectos se han hecho en una línea celular de médula suprarrenal (PC8b). La actividad de tirosina hidroxilasa cambia bajo condiciones de stress lo que explica el efecto de los glucocorticoides sobre el RNAm de tirosina hidroxilasa.

En cuanto a los posibles ligandos (neurotransmisores) involucrados se conoce poco; se ha reconocido a la sustancia K como inductor de una acumulación en los niveles de RNAm de tirosina hidroxilasa en la sustancia nigra (Friedman, et.al. 1988).

3) LA PRO-OPIOMELANOCORTINA.

La pro-opiomelanocortina (POMC) es una proteína (PM 30000) que se procesa post-traduccionalmente a varias hormonas peptídicas incluyendo la beta-endorfina, la hormona adrenocorticotropina (ACTH) y la hormona que estimula los melanocitos (MSH) (Eipper y Mains, 1982). Se expresa en una variedad de tejidos, siendo los sitios de máxima expresión los lóbulos, anterior e intermedio, de la pituitaria y la región periarqueada del hipotálamo (Liotta, A.S., et.al., 1979). Se describen algunos ejemplos de cómo se regula dicha proteína ya que hay abundante información sobre cuáles son las etapas del metabolismo de POMC que son moduladas, además de que se han hecho estudios sobre cuáles son los ligandos que alteran la respuesta y el probable mecanismo molecular involucrado (por ejemplo, los segundos mensajeros).

Los estrógenos de ovario ocasionan una disminución en el RNAm de POMC en el núcleo arqueado de hipotálamo (Wilcox, et.al. 1985), sugiriendo una regulación a nivel de la transcripción (cambios en los niveles de RNAm de POMC). En cultivos primarios de pituitaria (Eberwine, et.al, 1987) se observan cambios en los niveles de RNAm bajo el efecto de segundos mensajeros acoplados a un receptor; el CRF (el factor que libera ACTH en pituitaria y libera glucocorticoides en corteza suprarrenal) incrementa los niveles de RNAm de POMC mientras que la dexametasona, glucocorticoide sintético, lo disminuye. El efecto del glucocorticoide sintético siempre se observa después de que se ha adicionado CRF (y, no de manera inversa) lo que sugiere una interacción compleja entre ambos efectores para modular los niveles de RNAm. En relación al CRF, se han determinado los posibles mediadores intracelulares que intervienen en la respuesta; el AMPc y el Ca^{++} incrementan los niveles de RNAm sugiriendo que tienen un efecto mutuamente exclusivo. Estudios de análisis de transcripción nuclear han apoyado la idea de un efecto directo de los glucocorticoides y CRF sobre la transcripción del gene de POMC (Eberwine, et.al., 1987).

En pituitaria anterior e intermedia de rata se ha observado que los ésteres de forbol incrementan los niveles del RNAm de POMC y estimulan la liberación de péptidos producidos a partir de esta proteína. Estos resultados sugieren que también los ésteres de forbol (via de fosfoinosítidos) estimulan la transcripción del gene de POMC o inhiben el recambio del RNAm (Barinaga, M. et.al, 1985).

Estudios en el lóbulo intermedio de la hipófisis de rata han podido establecer un modelo de regulación dopaminérgica de la síntesis de POMC. La estimulación del receptor de dopamina D2 en la superficie del melanotrofo altera la propiedad de Gi inhibiendo la actividad de adenilato ciclasa y, por lo tanto, disminuyendo la concentración intracelular de AMPc. Esta disminución en AMPc resulta en menor capacidad de la célula para sintetizar POMC (Cote, et.al., 1986).

El receptor de dopamina es capaz también de inhibir la actividad de la acetiltransferasa (Milington, et.al. 1986), enzima que modifica post-traduccionalmente a la beta-endorfina, uno de los péptidos de POMC, señalando otro evento de modulación de la célula de POMC.

Otra etapa del metabolismo de POMC potencialmente modulable es su procesamiento. Bajo diferentes condiciones de stress, agudo vs. crónico, el procesamiento puede ser regulado diferencialmente (Shiomín, et.al. 1986). Parece haber una relación inversa entre el contenido de hormona de la glándula y su velocidad de procesamiento. Cuando los almacenes de hormona son altos (resultados observados con stress crónico), la velocidad de procesamiento es lenta. Cuando los niveles son bajos (stress agudo), la velocidad de procesamiento es más rápida y cuando los niveles se normalizan después de stress agudo y crónico, también lo hace la velocidad de procesamiento. Es probable que estos dos mecanismos representen dos niveles de control de la célula; uno a nivel del RNAm de POMC y el otro en el procesamiento subsecuente de POMC (nivel traducciona l y posttraducciona l).

4) LA PROLACTINA.

Para finalizar, un ejemplo representativo de lo que se conoce sobre mecanismos de regulación del metabolismo de neuropéptidos lo provee el estudio de la regulación de la biosíntesis y liberación de prolactina.

La prolactina es una hormona que se encuentra en adenohipófisis y que se ve afectada directamente por TRH, tanto en su biosíntesis como en su liberación. Los eventos mediados por

receptor hacen resaltar a un mediador intracelular como es el Ca^{++} el cual está fuertemente implicado en la regulación de la biosíntesis y liberación de prolactina. Estos estudios han utilizado líneas celulares de pituitaria GH3 y GH4 (Laverriere, et.al., 1988).

La TRH causa la liberación bifásica de prolactina por la activación de la degradación de fosfatidilinositol al generar diacilglicerol y fosfatidil inositol trifosfato.

Fosfatidilinositol trifosfato moviliza Ca^{++} intracelular (al liberarse del RER) y ocasiona una liberación del péptido en dos minutos -primera fase- mientras que el diacilglicerol, que activa la proteína cinasa C, junto con el aumento del Ca^{++} citosólico debido a su influjo a través de canales de Ca^{++} sensibles a voltaje, ocasionan la liberación del péptido durante 60 minutos -segunda fase-.

Se conoce que la regulación de la transcripción del gene de prolactina por TRH es debida a un incremento en la velocidad de transcripción. Estudiando los mediadores intracelulares acoplados con Ca^{++} , se ha observado que TPA (éster de forbol que activa la proteína cinasa C) activa la transcripción del gene pero a un grado menor que la TRH, indicando un papel limitado de la proteína cinasa C en la acción estimulante del péptido (al nivel del gene). El uso de iónoforos de Ca^{++} (A23187) y agonista de canales de Ca^{++} (BAY K8644) demuestran directamente la importancia de este ión sobre el incremento en la transcripción. Utilizando estas drogas en combinación, se ha demostrado que se requieren ambas vías, tanto la movilización intracelular de Ca^{++} como la activación de la proteína cinasa C. La ionomicina (iónóforo de Ca^{++}) requiere coexposición con TPA para reproducir el incremento inducido por TRH en la transcripción del gene de prolactina; en contraste el Bayk 8644 es capaz de mimetizar completamente la acción de TRH. Tomando en consideración las observaciones citadas y tomando en cuenta que ninguno de estos agentes actúa en una manera que es aditiva a TRH se puede hipotetizar que la movilización de los almacenes intracelulares de Ca^{++} , junto con la activación de la proteína cinasa C, pueden controlar la actividad de canales de Ca^{++} sensibles a voltaje, el cual regula la transcripción del gene de prolactina.

Este caso ejemplifica un mecanismo de regulación en donde un evento relacionado con un receptor induce la activación de dos vías de propagación diferentes que pueden estar interactuando entre sí y en donde el Ca^{++} juega un papel central para dar la respuesta apropiada (ya sea a nivel de biosíntesis o de liberación).

Ya que los objetivos centrales del trabajo involucran a una hormona en particular, la hormona que libera tirotrópina, la siguiente sección está dedicada a la descripción de la TRH y lo que se conoce sobre la regulación de su biosíntesis y liberación (metabolismo TRHérgico).

LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH).

La TRH fue el primer factor hipotalámico que se identificó (Guillemin, 1963; Boler, et.al., 1969; Schally, et.al., 1966). Es un tripéptido con ambas extremidades bloqueadas, pGlu-His-Pro-NH₂.

Por técnicas de inmunohistoquímica y radioinmunoensayo la TRH se ha localizado tanto en el hipotálamo como en regiones extrahipotalámicas. En el hipotálamo, la TRH se encuentra en mayor concentración en la eminencia media (Brownstein, et.al., 1974) y en núcleos hipotalámicos, incluyendo el dorsomedial, el ventromedial, el paraventricular y el periventricular (Hokfelt, et.al., 1975). Fuera del hipotálamo se ha encontrado en el cerebro anterior, el tallo cerebral y el diencéfalo posterior (Brownstein, et.al., 1974). También se ha localizado en el páncreas (Kawano et.al. 1983) y la próstata (Pekary, et.al., 1980).

BIOSINTESIS DE LA TRH.

La TRH, al igual que otros péptidos, se sintetiza por un mecanismo dependiente de ribosomas en el soma neuronal (McKelvy, 1977). Se sintetiza a partir de un precursor proteico de PM alto constituido por 255aa, en donde la secuencia de TRH (-gln-his-pro-gly-) se encuentra repetida 5 veces (Lechan, et.al. 1986); cada secuencia de TRH está flanqueada por aminoácidos básicos (lisina y/o arginina) -lys-lys-arg-gln-his-pro-gly (lys/arg)-arg. Este precursor es cortado por enzimas similares a la tripsina y los residuos básicos del péptido ya cortado son eliminados por enzimas similares a la carboxipeptidasa B. El amino terminal de la glutamina se cicliziza para formar un residuo de ácido piroglutámico por una o más enzimas recientemente caracterizadas (Busby, W.H., et.al., 1987), mientras que la glicina, que se encuentra en el carboxilo terminal, es la fuente del grupo amino donador para la alfa amidación de los residuos de prolina (Eipper, B.A., 1987). Llevadas a cabo estas serie de modificaciones queda la secuencia pGlu-His-Pro-NH₂.

Una vez que se ha sintetizado la forma precursora en el soma neuronal y que ha sufrido la serie de modificaciones post-traduccionales dentro de las vesículas de secreción, éstas viajan hasta las terminales nerviosas donde la TRH es liberada para actuar posteriormente en la célula blanco.

Bajo este contexto, en la neurona TRHérgica se llevan a cabo los siguientes procesos: transcripción, traducción, compartimentalización, procesamiento, liberación; cada uno de ellos es susceptible de ser regulado por diferentes señales (neurales y/u hormonales).

FUNCIONES DE LA TRH.

Los estudios realizados sobre la TRH se han enfocado en el eje hipotálamo-hipófisis, que como mencioné antes, conforma el área principal para la regulación de las funciones neuroendócrinas en un organismo.

En el hipotálamo, la TRH se encuentra en varios núcleos, siendo uno de ellos el núcleo paraventricular que participa en funciones importantes en el eje hipotálamo-hipófisis. En esta región se encuentran neuronas TRHérgicas que envían terminales a la eminencia media en donde la hormona es liberada para actuar en la adenohipófisis liberando prolactina y tirotropina (Reichlin, et.al., 1978). La tirotropina se libera a partir de los tirótrofos y viaja por el torrente sanguíneo hasta la glándula tiroidea para liberar las hormonas, triiodotironina (T3) y tiroxina (T4). Las hormonas tiroideas actúan en diversas regiones del organismo influyendo durante el desarrollo del cerebro así como en el metabolismo del animal adulto (Nunez, 1985). Las hormonas tiroideas ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la biosíntesis y liberación de la tirotropina (TSH) a nivel de hipófisis (Bowers, et.al., 1967) así como en la liberación inducida de TRH (Fukuda, et.al., 1975). Además, T3 y T4 regulan tanto la biosíntesis como la liberación de TRH a nivel de hipotálamo (Lechan y Jackson, 1983) (esto último se estudiará en detalle en la sección posterior).

La prolactina, liberada a partir de lactótrofos, interviene en la lactancia en mamíferos (entre otras funciones).

La TRH puede tener otras funciones no relacionadas con el eje-hipotálamo-hipófisis; por ejemplo como neurotransmisor, al localizarse en las otras áreas del cerebro, o como factor trófico (p.ej. en la médula espinal) (Reichlin, et.al., 1986)

ESTUDIOS SOBRE LOS POSIBLES COMPUESTOS REGULADORES DE LA BIOSÍNTESIS Y LIBERACION DE LA TRH.

LIBERACION DE TRH.

REGULACION NEURONAL. El hipotálamo se encuentra interconectado con varias regiones del sistema nervioso central, por medio de vías aferentes y eferentes. A las regiones hipotalámicas donde se localiza la TRH llegan diferentes proyecciones axonales de otras regiones cerebrales las cuales liberan diferentes productos que actuarían sobre las neuronas TRHérgicas, ya sea inhibiendo o estimulando la liberación del péptido. Dichos productos comprenden neurotransmisores, siendo los más estudiados la histamina, la noradrenalina y la dopamina (Joseph-Bravo et.al., 1979). Para

comprender el papel de los neurotransmisores en el proceso de liberación de la TRH se han hecho estudios utilizando diversos modelos, siendo los principales el uso de rebanadas y cultivos de células primarios, ambos de hipotálamo de cerebro de rata.

Es bien conocido el papel que tiene la dopamina sobre la liberación de neuropéptidos en hipotálamo. La dopamina estimula a la somatostatina (Robbins, et.al., 1985), a la LHRH -hormona que libera la hormona luteinizante- (Negro-Vilar, et.al., 1979) e inhibe a la beta-endorfina (Vernes, et.al., 1985). Sin embargo, el papel de la dopamina en el control de la liberación de TRH es todavía controversial. Grimm y Reichlin (1973) primero sugirieron que dopamina tiene un efecto estimulador sobre la liberación de TRH utilizando fragmentos hipotalámicos que fueron incubados con histidina marcada y fue incorporada a una sustancia similar a TRH (Grimm-Jorgensen y McKelvy, 1974). Otros, utilizando radioinmunoanálisis para cuantificación de TRH han observado efectos, tanto estimuladores (Schaeffer, et.al., 1977; Maeda y Frohman, 1980) como inhibitorios (Joseph-Bravo, et.al., 1979). Tales discrepancias parecen deberse al uso de diferentes preparaciones de tejido (fragmentos hipotalámicos, hipotálamo mediobasal, sinaptosomas).

Un trabajo más reciente utilizando hipotálamo adulto intacto demuestra el efecto de varios antagonistas y agonistas de dopamina sobre su acción estimuladora en la liberación de TRH; de este modo, disciriendo entre el tipo de receptor que está ejerciendo tal efecto. La dopamina, a través del receptor D2, estimula la liberación de TRH dependiente de la dosis (Lewis, B.M., et.al., 1987).

Recientemente, se ha trabajado en profundizar sobre cuáles son los mecanismos por medio de los que la neurona TRHérgica libera TRH bajo efecto de cierta influencia neural (p. ej. la influencia del neurotransmisor dopaminérgico). Para esto es importante el estudio de los segundos mensajeros (p.ej, Ca⁺⁺, AMPC, la vía de fosfoinosítidos). Se ha considerado el papel del Ca⁺⁺ en la liberación de TRH debido a su bien conocida intervención en el proceso de liberación de esta hormona (Joseph-Bravo, et.al. 1979; Loudes, et.al 1983).

Utilizando como sistema los cultivos primarios de hipotálamo (Loudes, et.al., 1988), se ha mostrado que al someter dichas células a un medio con concentraciones altas de K⁺ se libera la TRH. Este efecto es bloqueado por ausencia de Ca⁺⁺ extracelular lo

que sugiere que canales de Ca^{++} (dependientes de voltaje) están involucrados en la liberación del péptido. Además, al utilizar ésteres de forbol y diacilglicerol, activadores de la proteína cinasa C la liberación de la TRH se ve afectada (Loudes, et.al., 1988). . Esto permite especular sobre una posible activación de la proteína cinasa sobre los canales iónicos mediante un evento sinérgico entre ambos mecanismos.

En el mecanismo de liberación de TRH también se ha demostrado la intervención de los canales de Na^+ y la proteína calmodulina (Cheung, 1980; Klee, et.al. 1980).

En resumen, se conocen algunas de las influencias neurales que están modulando la liberación de TRH en hipotálamo y existen algunos estudios que han empezado a abordar cuáles son los mecanismos intracelulares que median la liberación de TRH. Es necesario el estudio más detallado y amplio sobre dichos procesos y, sobre todo, relacionarlos con las influencias neurales externas que estimulen la liberación de TRH.

REGULACION HORMONAL. Los estudios sobre la liberación de TRH en hipotálamo afectada por influencias hormonales son escasos. En primer lugar, Jackson y Lechan (1983) demostraron que las hormonas tiroideas pueden ser reguladores de la liberación de TRH y recientemente Yamada (1990), también ha estudiado como el estado tiroideo influye sobre la liberación de esta hormona en hipotálamo.

Otras hormonas, como la testosterona, parecen estar modulando a la neurona TRHérgica en hipotálamo incrementando su liberación (Pekary, A.E., et.al., 1990).

ESTUDIOS SOBRE BIOSINTESIS DE TRH. REGULACION NEURAL Y HORMONAL.

La regulación de la biosíntesis de TRH puede darse a diferentes niveles: por cambios en la transcripción o la estabilidad del RNAm de TRH o bien, en el procesamiento del precursor proteico por algunas de las diferentes enzimas involucradas (Glembotski, 1986).

La mayoría de los estudios sobre regulación de la biosíntesis de TRH se han enfocado a determinar cómo se modula el contenido de TRH y del RNAm de TRH en diferentes estados tiroideos. Segerson (1982) encontró que la expresión del gene de TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo es regulado por hormonas tiroideas. Utilizando análisis de hibridación in situ cuantitativa encuentran que los niveles de RNAm de TRH se incrementan en ratas hipotiroideas. Estas observaciones fueron confirmadas por Koller, et.al., 1987 quien demostró que en el hipertiroidismo decrecen los niveles de RNAm TRH en este núcleo. Por otro lado, los niveles de RNAm de TRH en el hipotálamo lateral y el núcleo reticular del tálamo no se ven influenciados por deficiencia o exceso de hormonas tiroideas. Con base en estos estudios de hibridación se ha propuesto que la regulación de la expresión del gene de TRH está controlado diferencialmente en varias regiones del cerebro, pero no se sabe si las alteraciones en el RNAm ocurren a nivel transcripcional ni si otras especies de RNAm en neuronas paraventriculares son también reguladas.

Otros moduladores potenciales de la biosíntesis de TRH incluyen las catecolaminas y los corticoioesteroides. La depleción de las catecolaminas en la rata neonatal decrece el contenido y secreción de este péptido dentro del hipotálamo (Engler, et.al. 1980). Se ha reportado recientemente que los corticoesteroides incrementan los niveles de RNAm de TRH en células CA77, una línea celular de carcinoma tiroideo medular de rata (Sevarino, et.al, 1988).

En cultivo primario de células de hipotálamo se ha medido la síntesis de novo de TRH (por incorporación de aminoácidos precursores tritiados)-bajo un estímulo despolarizante y a diferentes tiempos de maduración del cultivo (in vitro) (Loudes, et.al., 1989). Bajo las condiciones utilizadas no se observa ningún cambio en la radioactividad incorporada en TRH neosintetizado (condiciones: maduración, aceleración de la última

etapa de procesamiento de TRH por la piroglutamilaminopeptidasa -PAM- con ascorbato; y la estimulación de la liberación de TRH por una concentración de K⁺ elevada) pero sí existe un incremento en la liberación del péptido. Esto sugiere que en estas tres situaciones hay cambios en el procesamiento de precursores almacenados más que en su neosíntesis y que es, en este procesamiento donde las influencias regulatorias pueden ejercer sus efectos.

Las hormonas tiroideas también pueden estar ejerciendo una regulación a nivel de la última etapa de procesamiento de TRH, sobre la enzima PAM que convierte TRH-gly a TRH maduro (Simard, et.al. 1989). En el hipotiroidismo se observa un aumento de TRH-gly/TRH en glándula pituitaria, sangre y sistema reproductivo. En este último, los niveles de TRH-gly están altamente correlacionados con los niveles de T3 y T4 en el suero. El TRH también incrementa los niveles de TRH-gly en las pituitarias, posterior y anterior, y las concentraciones sanguíneas de péptidos que cruzan con el anticuerpo a TRH-gly (Simard, et.al. 1989). Por otra parte, la reciente identificación de células no tirotróficas multihormonales con gránulos secretorios que contienen TRH, en glándula pituitaria, apoya que este péptido pudiera estar ejerciendo una regulación 'shortfeedback' sobre las células TRHérgicas.

En un estudio reciente determinan las influencias de las hormonas tiroideas sobre la biosíntesis de TRH en hipotálamo. En éste miden las concentraciones, tanto de TRH como del RNAm TRHérgico lo que permite un examen de los efectos de las hormonas tiroideas tanto sobre la regulación transcripcional del gene como sobre la expresión post-traduccional. Los resultados indican que bajo hipotiroidismo hay una disminución en los niveles de TRH con un incremento en los niveles del RNAm, sugiriendo que las hormonas tiroideas ejercen efectos inhibitorios sobre la traducción del RNAm de preproTRH, además de regular recíprocamente la transcripción del gene TRH (Yamada, M y Wilber, J.F., 1990).

OBJETIVOS.

El objetivo general de este trabajo es el estudio de la regulación de la biosíntesis de TRH en cultivos de células dispersas de hipotálamo de cerebro de rata, con la finalidad de comprender si la transmisión nerviosa afecta dicha etapa del metabolismo TRHérgico.

Los objetivos particulares son: la optimización de la técnica de cultivo primario de células dispersas de hipotálamo para el estudio y evaluación de los mediadores intracelulares que pudiesen estar mediando una regulación a nivel de la biosíntesis de TRH en neuronas.

1o. Optimización de la técnica de cultivo de células dispersas de hipotálamo de cerebro de rata. Para esto, cumplir con los siguientes requisitos:

-que el procedimiento para hacer el cultivo diese como resultado un rendimiento y una sobrevivencia celulares, altos

-que el cultivo (una vez sembrado) desarrollara células con características morfológicas de neurona y glia

-que la duración in vitro del cultivo fuese lo suficientemente buena para garantizar una total diferenciación de las neuronas TRHérgicas y poder determinar suficientes cantidades de RNAm de TRH así como TRH intracelulares.

2o. Estudio y evaluación de los mediadores intracelulares que pudiesen estar modulando la biosíntesis de TRH en cultivos de neuronas de hipotálamo.

Para esto, en primer lugar estudiar los mediadores intracelulares que acoplados a un receptor pueden regular tanto los niveles de RNAm TRH como de la TRH intracelular. Adicionalmente, estudiar si la liberación de TRH en las neuronas esta siendo regulada. El primer mediador intracelular por probar es el 8-bromo-AMPC, análogo del AMPc.

MATERIALES Y METODOS.

MATERIALES.

Los reactivos utilizados para la preparación de los cultivos primarios fueron:

Medio dulbeco (DMEM) al que se le adicionaron los siguientes aditivos: glucosa, vitaminas, glutamina, antibióticos (obtenidos de Gibco Labs) e insulina (Sigma). Se utilizó poli-D-lisina como sustrato de las células (Sigma).

Para el procedimiento de dispersión enzimática se utilizó: tripsina y DNAasa, ambas obtenidas de Sigma. Todos los reactivos una vez preparados se guardaron en alícuotas bajo las concentraciones necesarias y se mantuvieron a -20 grados C hasta el uso.

Se usaron cajas Petri de 60mm de diámetro, de Costar (tipo cultivo).

El material utilizado para la extracción de RNA total fueron: trizma base, EDTA -ácido etilendiaminotetraacético- (Sigma); SDS -dodecil sulfato de sodio-(BioRad); DTT -ditiotreitól- (Pierce); urea y LiCl (Merck).

El "nick-translation" se realizó utilizando el DNA complementario de TRH (obsequio del Dr. Goodman) y, alfa-d-CTP (P32) de Amersham.

Para estudiar los factores involucrados en afectar la biosíntesis y liberación de TRH se utilizó:

El 8-bromo-AMPC y la forskolina (Sigma). El 8-bromo-AMPC se preparó en medio Dulbeco en el momento de utilizarse a la concentración requerida. La forskolina se preparó en DMSO -dimetilsulfóxido- y se guardó en alícuotas a -20 grados centígrados a la concentración requerida.

METODOS

TECNICA DE CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE CEREBRO DE RATA.

La técnica de cultivo de células dispersas de hipotálamo de cerebro de rata consta de tres etapas fundamentales:

disección
dispersión
siembra

DISECCION

Ratas Wistar de 18 días de gestación se anestesiaron con hidrato de cloral (3.5g/Kg de peso) para hacer la laparatomia; se extrajeron 16 fetos, uno por uno, para efectuar la disección de los hipotálamos bajo el microscopio estereoscópico. Primero se cortó (sagitalmente) a nivel de orificios auditivos y ojos. Se colocó el cerebro ventralmente y se obtuvo la región hipotalámica haciendo un corte anterior al quiasma óptico, lateralmente a lo largo de los surcos laterales, posteriormente incluyendo los cuerpos mamilares y en profundidad a lo largo del tálamo (aprox. 3mm de profundidad). 16 hipotálamos se colocaron en medio dulbeco o buffer Hank,s BSS (distribuidos 3 hipotálamos/ml de medio) dependiendo del procedimiento de dispersión (mecánica o enzimática).

DISPERSION.

Dispersión Mecánica.

Para realizar este procedimiento se distribuyeron 3 hipotálamos/ml de DMEM con aditivos (DMEM completo sin suero). Se procedió a cortar los hipotálamos con tijeras en fragmentos de aproximadamente 1mm y se hizo la dispersión mecánica utilizando dos pipetas Pasteur cada una con un orificio de tamaño diferente: cada grupo de tejido hipotalámico se pasó cerca de 10 veces por cada una de las pipetas hasta que se observó una buena dispersión. Hecho lo anterior se reunieron las suspensiones de tejido en DMEM completo más suero y se centrifugó a 1000 rpm por 5 minutos (Centrífuga ROTO-UNI II BHG). Se resuspendió el sedimento en 2ml de DMEM completo (más suero) y se contaron el número de células vivas utilizando una solución de azul tripano (colorante de tinción vital). Realizado el conteo celular se lleva a cabo la siembra en platos de 60mm de diámetro previamente tratados con poli-D-lisina.

Dispersión Enzimática.

Para realizar este procedimiento los hipotálamos fetales se colocaron en buffer Hank's BSS (NaCl, KCl, KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , glucosa) -3 hipotálamos/ml-. Se cortaron los hipotálamos con tijeras y se procedió a incubarlos con una solución enzimática (1.25mg/ml de tripsina + 1.0 mg/ml de DNAasa) durante 10 minutos a 37 grados C. Posteriormente se lavó 2 veces la suspensión celular con DMEM completo (más suero) y se terminó la dispersión pasando el tejido 10 veces con una pipeta Pasteur de orificio reducido. Se centrifugó la suspensión (1000 rpm por 4 minutos, centrífuga ROTO-UNI BHG) y se resuspendió el sedimento en 2 ml de DMEM completo (más suero). Se hizo el conteo de número de células vivas utilizando el colorante de tinción vital, azul tripano. Y, finalmente se sembraron las células en 4ml de DMEM completo más suero sobre platos de 60mm de diámetro previamente tratados con poli-D-lisina.

Después de sembradas las células (independientemente del proceso de dispersión utilizado) se conservaron a 37 grados C con 5% de CO_2 en un ambiente húmedo (incubador NAPCO).

MANIPULACIONES DE LAS CELULAS.

Después de 18 días *in vitro*, las células se incubaron con las diferentes drogas durante 24 horas: 8-bromo-AMPC 1mM, forskolina 20 μ M. El medio se cambió antes de cada análisis experimental. Después del tiempo de exposición a las drogas se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS (buffer fosfato de dulbeco), se rasparon, se centrifugaron a 12000g por 1 minuto (Microfuga, BECKMAN) y se congelaron (-70 grados C) para extraer el RNA total.

EXTRACCION DE RNA TOTAL.

Todos los sedimentos congelados se homogenizaron en una solución de 1 ml de urea 6M y LiCl 3M y se incubaron toda la noche a -20 grados C. El homogenado se centrifugó a 4 grados C por 10 minutos a 12000g (Microfuga Beckman). El sobrenadante se eliminó (conteniendo DNA y proteínas) y el sedimento fue extraído: 2X con 400 μ ls de buffer tris.HCl 0.1M pH 9.0, 0.01M EDTA -ácido etilendiaminotetraacético-, 0.1M DTT -ditiotreitól-, 2% SDS -dodecilsulfato de sodio-y 400 μ ls de fenol:cloroformo (1:1); a la fase acuosa se le adicionó acetato de sodio 3M (1/10 del volumen), etanol frío (2 veces del volumen) y se dejó a -70 grados C toda la noche para precipitar el RNA total. Se centrifugó a 12000 g por 10 minutos (microfuga Beckman) y el sedimento se lavó con etanol al 75% frío, finalmente se resuspendió en 50 μ ls de H₂O (previamente tratada con dietilpirocarbonato).

Las muestras de RNA se corrieron en minigeles de agarosa al 1% con 0.5ug/ml de bromuro de etidio para la cuantificación (200V por 5 minutos). La cuantificación se hizo por densitometría de las bandas de RNA ribosomal (teñidas con bromuro de etidio). Para verificar la pureza de las muestras, éstas se corrieron en un gel de agarosa al 1% (con formaldehído 2.2M, buffer fosfato de sodio 120mM pH 7.0) y se tiñeron con bromuro de etidio.

CUANTIFICACION DE RNAM DE TRH (ANALISIS DE NORTHERN).

CDNA de TRH se marcó por "nick-translation" obteniendo una actividad específica de $1-5 \times 10^8$ cpm/ug. Las muestras de RNA se corrieron en geles de agarosa al 1% (conteniendo formaldehído,

buffer fosfato de sodio 10mM pH 7.0) y se transfirieron a papel de nitrocelulosa. La hibridación se efectuó a 42 grados centígrados en 5XSSC, 1X DENHARDT, 20mM de buffer fosfato de sodio 20mM pH 6.5, dextran sulfato y formamida al 50%. Las bandas de RNAm TRH se cuantificaron por densitometría, en un densitómetro Hoeffler Scanning GS 300 y los valores se normalizaron para el RNA total. Todos lo datos se midieron dentro de un rango linear de detección.

NIVELES DE TRH EN EL CONTENIDO DE LAS CELULAS Y EN EL MEDIO.

Cultivos de 18 a 23 días in vitro se trataron con las diferentes drogas (ver sección manipulaciones celulares) y el medio fue eliminado (para detección de TRH). Las células se lavaron dos veces con PBS, se les adicionó ácido acético al 20% y se congelaron a -20 grados centígrados para extraer el péptido para radioinmunoanálisis. El radioinmunoanálisis específico se hizo de acuerdo al procedimiento experimental de Méndez (Méndez, M. 1987)

Niveles de TRH en el Medio de Cultivo.

Los medios se obtuvieron de los cultivos después de la exposición a las diferentes drogas, se les adicionó ácido acético al 20% final (para inhibir las enzimas que degradan TRH) y se guardaron a -20 grados C. Los medios se pasaron por columnas de SEP-PAK C18 para eliminar sales y medir los niveles de TRH por radioinmunoanálisis (de acuerdo a Mendez, M. 1987).

RESULTADOS.

I. OPTIMIZACION DE LA TECNICA DE CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE CEREBRO DE RATA.

Como primer paso para abordar el estudio de la regulación de la biosíntesis de TRH fue necesario definir las condiciones metodológicas óptimas para obtener cultivos primarios de células dispersas hipotalámicas que presentaran las siguientes características fundamentales:

- sobrevivencia y rendimiento celulares altos
- células con características morfológicas de neurona y glia (por comparación con otros reportes)
- detección tanto de niveles de TRH como de su RNAm intracelulares suficientes para realizar los ensayos experimentales.

El procedimiento para preparar cultivos primarios de células dispersas consta de tres etapas fundamentales: disección, dispersión y siembra. La dispersión forma un paso crítico ya que de ésta depende en gran medida la viabilidad y el rendimiento celulares. Se optimizaron dos procedimientos de dispersión: mecánica y enzimática y simultáneamente se manejaron otras variables (ver las TABLAS, I y II) para obtener cultivos de una sobrevivencia in vitro adecuada para los fines de este trabajo.

10. Dispersión mecánica. Se manejaron un conjunto de variables descritas en la TABLA I (a y b) con la finalidad de obtener una viabilidad y rendimiento celulares altos. Los resultados nos indicaron que distribuyendo 3 hipotálamos por ml de medio Dulbecco y dispersándolos con pipetas Pasteur (con orificio de dos tamaños) -ultimo procedimiento en la tabla Ia- se obtenía una viabilidad de 48 % y un rendimiento de 1.93×10^5 células vivas por hipotálamo. Se manejaron otras variables pensando en la sobrevivencia in vitro del cultivo; la más importante fue definir el momento adecuado para adicionar el antimetabólico, citosina- β -D-arabinofuranosido (10uM) -ver la tabla Ib-. El procedimiento final quedó como se describe en métodos y se sembraron 3.0×10^6 células vivas por plato de 60mm de diámetro. Se obtuvieron cultivos que presentaban células con

características morfológicas de neurona y glia y cuya sobrevivencia in vitro fue de 30 días (ver FIGURA 2.1).

Al obtener dichos resultados se prepararon cultivos bajo este método y se definió si era posible determinar niveles de RNAm (por análisis de Northern, ver métodos). Se tomaron cultivos de 5, 10, 18 y 23 días in vitro. Los diferentes análisis indicaron que a 18 días de incubación era posible detectar RNAm de TRH, sin embargo las determinaciones no fueron reproducibles. Además por el rendimiento celular que se obtuvo se sembraban de 2 a 3 platos por cultivo. Ambos resultados nos indicaron que el procedimiento utilizado era poco eficiente para abordar los objetivos del proyecto.

20. Dispersión Enzimática. Para optimizar este procedimiento de dispersión se probó tripsina a diferentes concentraciones, después se implementó con DNAasa (ver la TABLA II). Los resultados indicaron que utilizando un cocktail de enzimas con tripsina 1.25 mg/ml más DNAasa 1.0mg/ml se obtenía una viabilidad hasta del 95% y además, haciendo la distribución del tejido de 3 hipotálamos por ml de buffer Hank's se obtenía un rendimiento de hasta 3.0×10^6 células vivas por hipotálmo (ver la tabla III donde se ejemplifican algunos resultados de diferentes cultivos hechos con este procedimiento). Se aumentó el número de células sembradas por plato de cultivo de 60mm de diámetro (de 8 a 10×10^6 células vivas por plato, siendo igual a aproximadamente 4 hipotálamos fetales) lo cual nos aseguró las determinaciones de los niveles de RNAm de TRH (ver sección expresión del RNAm TRH).

DESCRIPCION MORFOLOGICA DE LOS CULTIVOS.

Los cultivos preparados por el procedimiento de dispersión enzimática presentaron la siguiente morfología conforme transcurrieron los días de incubación in vitro (FIGURA 2.2).

Al primer día de la siembra se observaron células redondeadas aisladas; al siguiente, se empezaron a ver pequeñas agrupaciones celulares y el inicio de la aparición de neuritas (pequeños filamentos que salen del soma). Al tercer día comenzó a aparecer la capa basal que de acuerdo a reportes (Benda, et.al. 1975) constituye astroglia y células neuroepiteliales indiferenciadas, sobre esta capa basal se observaron células con características morfológicas de

neuronas (con ramificaciones) e interconexiones entre las pequeñas agrupaciones celulares. En este día se les adicionó el antimetabólico, citosina- β -D-arabinofuranosido (10 μ M) para inhibir la proliferación de células no neuronales. Al siguiente día (4o.) se hizo cambio de medio para diluir el antimetabólico: se observaron células muertas y en este momento fue posible definir con claridad la formación de células neuronales bipolares y multipolares. Se ha reportado que las neuronas TRHérgicas son en su mayoría células bipolares y algunas multipolares (Tixier-Vidal, et.al, 1975). También pudo definirse con claridad, las células poliédricas de la capa basal así como las interconexiones entre las agrupaciones celulares.

Los días subsecuentes se observó una maduración de las células con características de neuronas (su forma fue más definida) y el inicio de proliferación de las células gliales de tal modo que al llegar al 30avo. día de incubación in vitro no se pudo apreciar con claridad un cultivo mixto de células neuronales y gliales sino un conglomerado celular (Nota: observar en la figura la presencia de células con características morfológicas de neuronas al día 18 de incubación) (FIGURA 2.2).

EXPRESION DEL RNAm DE TRH. ONTOGENIA IN VITRO DE CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE CEREBRO DE RATA.

Se extrajo RNA total de cultivos preparados por el método enzimático (FIGURA 2.3) a diferentes días de incubación in vitro: 7, 14, 21. En la FIGURA 2.4 se puede apreciar cómo existe un incremento en la cantidad de RNAm de TRH conforme transcurren los días de incubación siendo éste más marcado entre 7 y 14 días iniciales. Estos resultados muestran que cultivos entre 18 y 23 días son adecuados para estudiar el efecto de los diversos efectores que pudiesen regular la biosíntesis de TRH.

EFECTO DE SEGUNDOS MENSAJEROS SOBRE LA BIOSINTESIS DE TRH Y SU LIBERACION.

EFECTO DEL 8-BROMO-AMPC SOBRE LOS NIVELES DE RNAm de TRH. Cultivos, entre 18 y 23 días fueron incubados con 8-bromo-AMPC 1mM por 24 horas. Los resultados que se pueden apreciar en la FIGURA 2.5 indican un incremento del 100 % en relación al control en los niveles de RNAm de TRH.

Con la finalidad de corroborar el efecto del 8-bromo-AMPC y asegurar que la vía del AMPC es la que está afectando los niveles de RNAm de TRH se probó forskolina 20uM. Este efector ocasionó un aumento de 4 veces en los niveles de RNAm en relación al control (FIGURA 2.6).

EFECTO DEL 8-BROMO-AMPC 1mM SOBRE LA CANTIDAD DE TRH INTRACELULAR Y EL TRH LIBERADO.

El 8-bromo-AMPC 1mM también ocasionó un efecto sobre el TRH intracelular y sobre el TRH liberado. En la FIGURA 2.7 se puede apreciar una disminución de aproximadamente 50% sobre la cantidad de TRH en relación al control y un incremento en el TRH liberado del 100%. También, observar la TABLA IV.

En conjunto, estos resultados indicaron que el AMPC está ocasionando un efecto en la neurona TRHérgica: produce un incremento en los niveles de RNAm de TRH y en la liberación del péptido con una disminución en la cantidad de la TRH intracelular.

TABLA la. OPTIMIZACION DE LA DISPERSION MECANICA.

VARIACION	RENDIMIENTO (células vivas x hipotálamo; x 10 ⁶)	SOBREVIVENCIA	PRUEBAS
1. pipeta Pasteur con orificio fino y, después filtrar las células con malla de nylon.	0.4	45% (0.18 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Se hizo conteo celular antes y después de la malla y, después de centrifugar. Hubo pérdida celular
2. pipeta Pasteur con orificio redondeado y, después con jeringas. Corte con tijeras antes de iniciar la dispersión.	0.95	36.1% (0.34 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Jeringas: 1o. 5 veces con 1/4 de diámetro 2o. 5 veces con 1/4 de diámetro
3. dispersión igual que anterior disección de hipotálamos con pipeta Gilson de 50 uis	0.54	44.4% (0.24 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Se hicieron diferentes pruebas para determinar el volumen de la estructura hipotalámica y, extraerla correctamente. Demasiado tiempo para realizar la disección.
4. dispersión con: pipetas Pasteur: 1o. con orificio redondeado y 2o. con orificio fino. Se anestesiaron las ratas.	1.25	42.4% (0.53 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Se anestesiaron las ratas para extraer feto por feto y hacer la disección, pero la irrigación sanguínea se interrumpió.

TABLA 1a. OPTIMIZACION DE LA DISPERSION MECANICA.

VARIACION	RENDIMIENTO (células vivas x hipotálamo; x 10 ⁶)	SOBREVIVENCIA	PRUEBAS
1. pipeta Pasteur con orificio fino y, después filtrar las células con malla de nylon.	0.4	45% (0.18 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Se hizo conteo celular antes y después de la malla y, después de centrifugar. Hubo pérdida celular
2. pipeta Pasteur con orificio redondeado y, después con jeringas. Corte con tijeras antes de iniciar la dispersión.	0.95	36.1% (0.34 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Jeringas: 1o. 5 veces con 1½ de diámetro 2o. 5 veces con ¼ de diámetro
3. dispersión igual que anterior disección de hipotálamos con pipeta Gilson de 50 uls	0.54	44.4% (0.24 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Se hicieron diferentes pruebas para determinar el volumen de la estructura hipotalámica y, extraerla correctamente. Demasiado tiempo para realizar la disección.
4. dispersión con: pipetas Pasteur: 1o. con orificio redondeado y 2o. con orificio fino. Se anestesiaron las ratas.	1.25	42.4% (0.53 x 10 ⁶ células vivas por hipotálamo)	Se anestesiaron las ratas para extraer feto por feto y hacer la disección, pero la irrigación sanguínea se interrumpió.

VARIACION

RENDIMIENTO
(células vivas
x hipotálamo; x 10^6)

SOBREVIVENCIA

PRUEBAS

5. dispersión con
pipeta Pasteur:
1o. con orificio
redondeado;
2o. con orificio
fino. Se aneste-
sieron las ratas
para hacer la
disección.

1.32

42.4%
(0.53×10^6
células vivas
por hipotálamo)

Exito en la irrigación
sanguínea: se extrajeron
los fetos uno por uno.
Disección adecuada de los
hipotálamos.
Distribución de hipotálamos
(2 hipotálamos/ml de medio)

5.a. igual que anterior

1.93

48.24%
(0.93×10^6
células vivas
por hipotálamo)

Procedimiento adecuado

TABLA 1b. SEGUNDO GRUPO DE VARIABLES MANIPULADAS PARA OPTIMIZAR EL PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DEL CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE CEREBRO DE RATA.

DISPERSION	RENDIMIENTO (células vivas por hipotálamo)	SOBREVIVENCIA	VARIABLE	OTRO DATO.
1. mecánica	0.33	37.5%	adición del antimitótico al 6o. día	cultivo con buenas características celulares. Se utilizó para determinación de la expresión de RNAm de TRH a diferentes días de incubación.
2. mecánica	0.50	32.0%	adición del antimitótico al 4o. día	se observan mayor proporción de células gliales. Muerte a los 14 días de incubación in vitro.
3. mecánica	0.72	40.0%	adición del antimitótico al 4o. día	
4. mecánica	0.80 0.59 2.00 1.78 1.07	31.7% 34.7% 50.6%* 44.0%* 33.7%*	distribución del tejido en 3 tubos/ml de DMEM 4hipotálamos/ml 2hipotálamos/ml*	observaciones estructu- rales: fibras finas "network" menos sofisti muerte súbita de los
5. mecánica	0.98	38.2%	adición del antimitótico al 2o. día	Se utilizó para extracción de RNA citoplásmico a los 16 días de incubación

TABLA II. OPTIMIZCION DE LA DISPERSION ENZIMATICA Y LA MANIPULACION DE ALGUNAS VARIABLES PARA EL PROCEDIMIENTO DE LA PREPARACION DEL CULTIVO Y SU VIABILIDAD IN VITRO.

ENZIMA	RENDIMIENTO ($\times 10^6$) (células vivas por hipotálamo)	SOBREVIVENCIA (%)	ALGUNA VARIABLE ADICIONAL U OBSERVACION.
1. TRIPSINA 0.125%	0.45	42.1	distribución del tejido en 3 hipotálamos por ml de buffer Hank's BSS. adición del antimetabólico al 3er. día de incubación in vitro. Cultivo con buenas condiciones morfológicas y duración de 30 días.
2. TRIPSINA 0.25%	0.50 0.48 0.72 1.22	74.1 67.0 56.1 90.8	aparición de debris: muerte celular (en todos)
3. TRIPSINA 0.125% y DNAasa 0.5mg/ml	0.77	89.5	distribución del tejido en 3 hipotálamos por ml de buffer Hank's BSS. adición del antimetabólico al 3er. día de incubación in vitro. Cultivo con buenas características morfológicas (ver TEXTO para descripción detallada). Duración 30 días.

TABLA IV. EFECTO DE 8-BROMO-AMPc 1mM SOBRE LA CANTIDAD DE TRH INTRACELULAR Y EN EL MEDIO

CANTIDAD DE TRH INTRACELULAR:

No. CULTIVO	No. DE CELULAS	EXPERIMENTO	ug. PROTEINA	pg. TRH	pg TRH/mg PROTEINA
1	10 x 10 ⁶	control	378	580	1534
		8-bromo-AMPc	360	279	775
2	10 x 10 ⁶	control	504	304	608
		8-bromo-AMPc	522	252	482
3	8 x 10 ⁶	control	300	524	1749
		8-bromo-AMPc	300	260	866

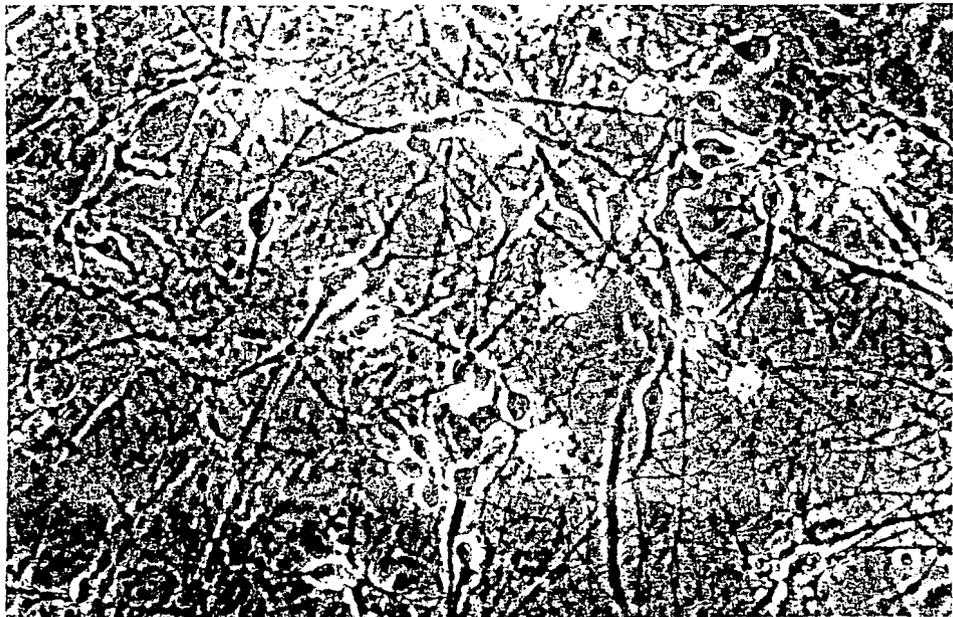
CANTIDAD DE TRH EN EL MEDIO:

No. CULTIVO	EXPERIMENTO	pg TRH
1	control	26
	control	41
	8-bromo-AMPc	137
	8-bromo-AMPc	108
2	control	21
	8-bromo-AMPc	105
3	control	37
	8-bromo-AMPc	103
4	control	44
	control	63
	8-bromo-AMPc	140
	8-bromo-AMPc	125

FIGURAS

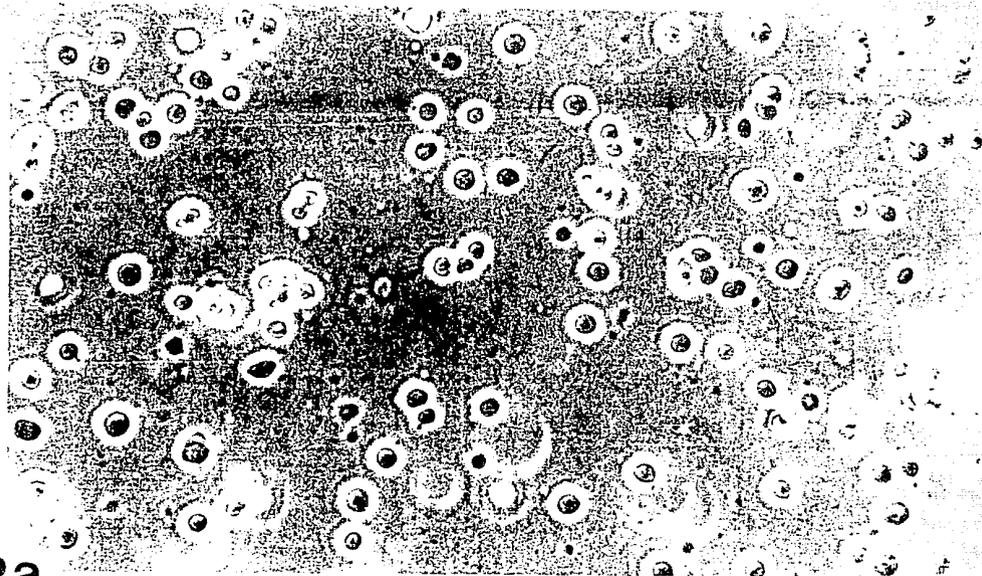
FIGURA 2.1. CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE RATA. En la figura se muestra un cultivo de 18 días de incubación in vitro (E17 + 18) hecho por el procedimiento de dispersión mecánica descrito en METODOS. Observar que hay una capa basal (astroglia y ependimocitos indiferenciados) y sobre ésta se observan células con características morfológicas de neuronas (bipolares y multipolares). Estos cultivos tuvieron una duración in vitro de 30 días.

FIGURA 2.1.

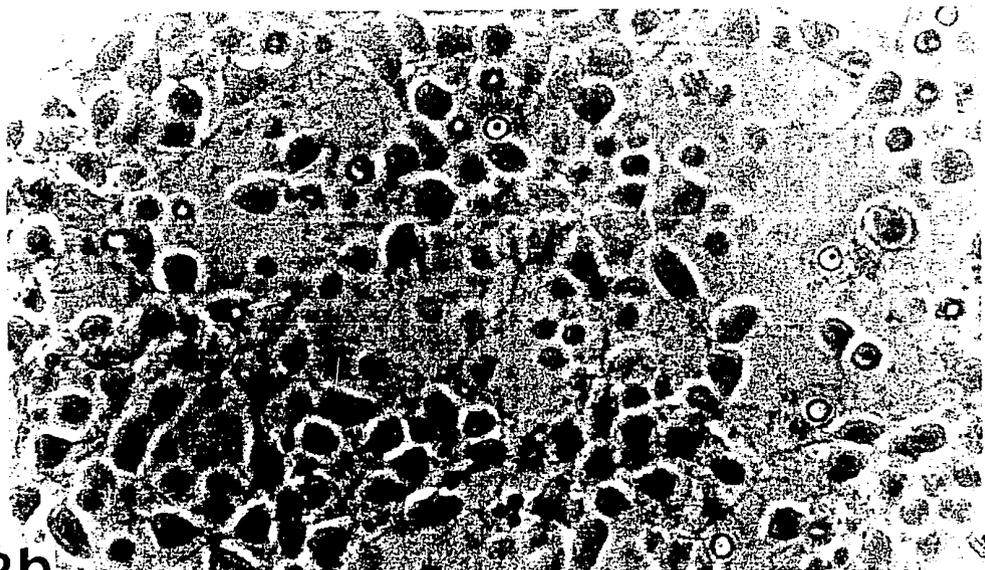


CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE RATA.

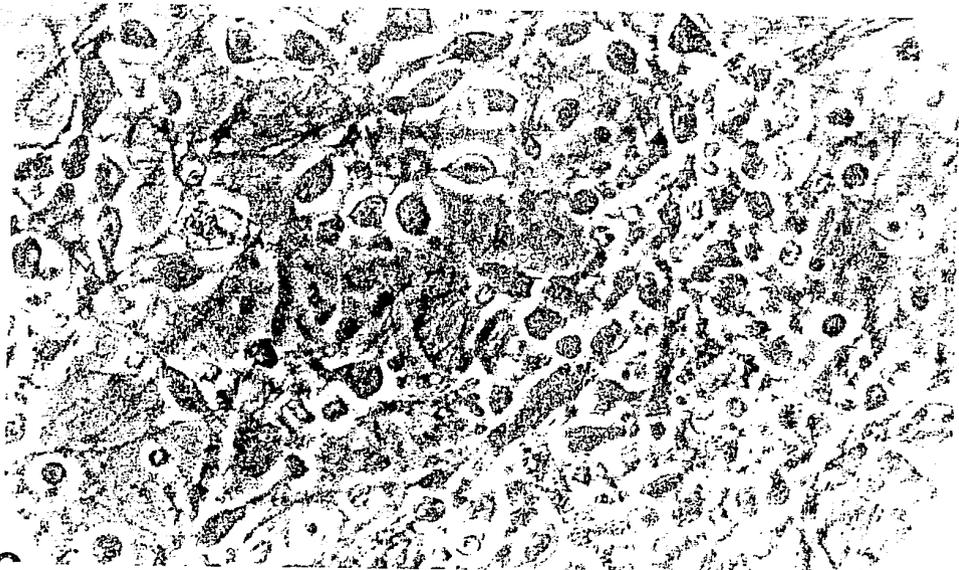
FIGURA 2.2 DESCRIPCION MORFOLOGICA DE CULTIVOS DE HIPOTALAMO DE RATA. En la figura se observan impresiones de cultivos tomados a partir de diferentes días de incubación in vitro (E17 + +1(2.a), +2(2.b), +3(2.c), +4(2.d.), +7(2.e), +14(2.f), +18(2.g), +21(2.h), +25(2.i), +30(2.j.)). Ver RESULTADOS para la descripción morfológica.



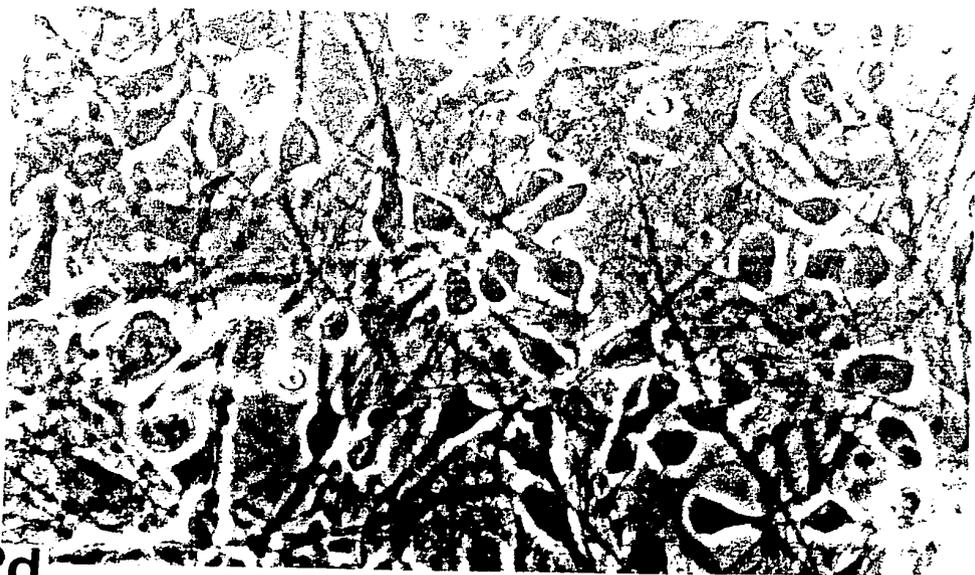
2a



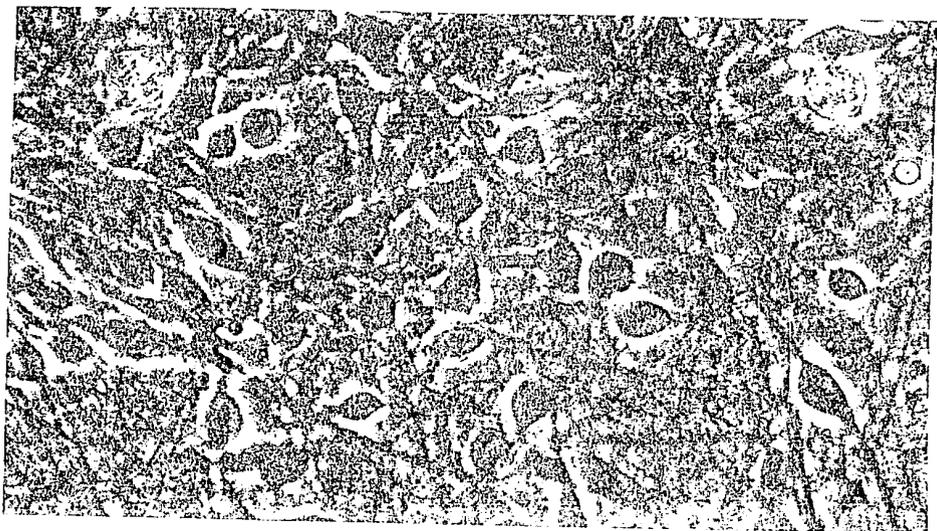
2b



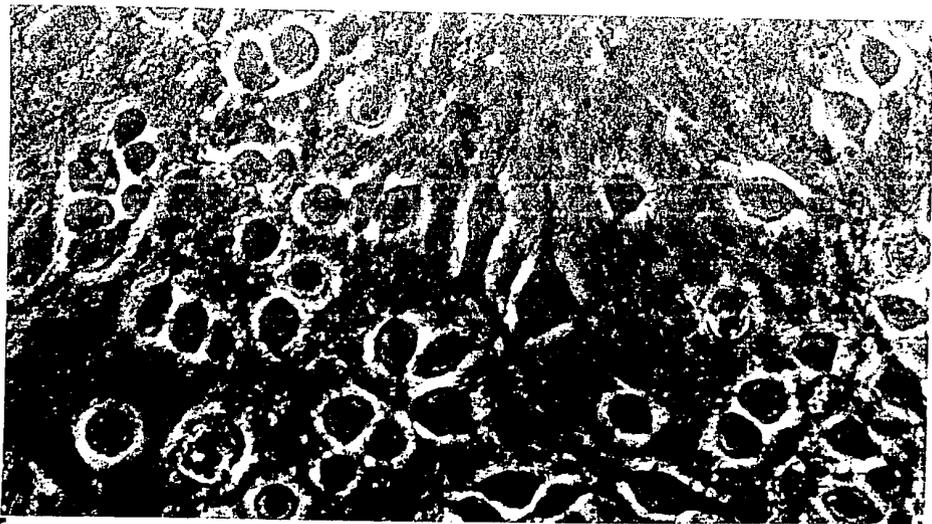
2c



2d

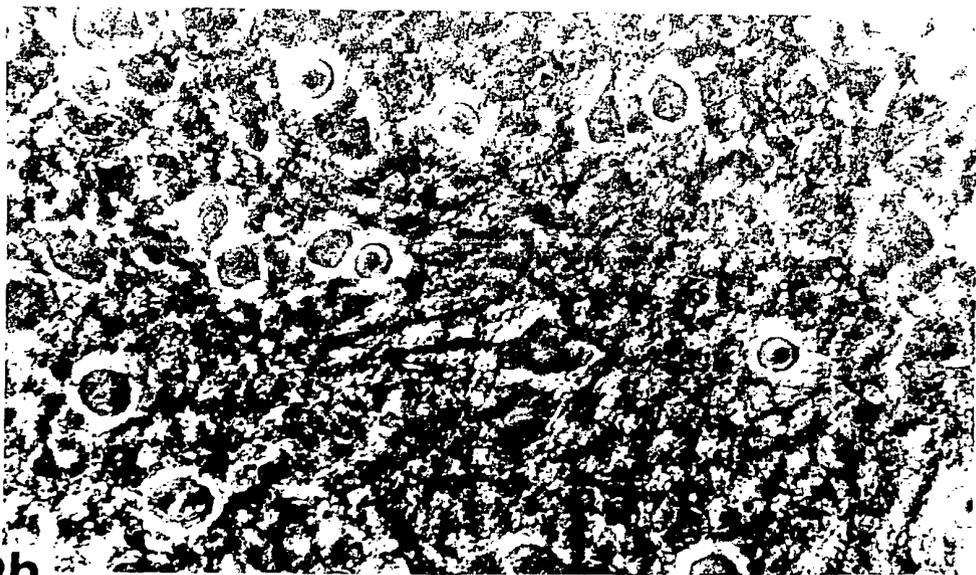


2e

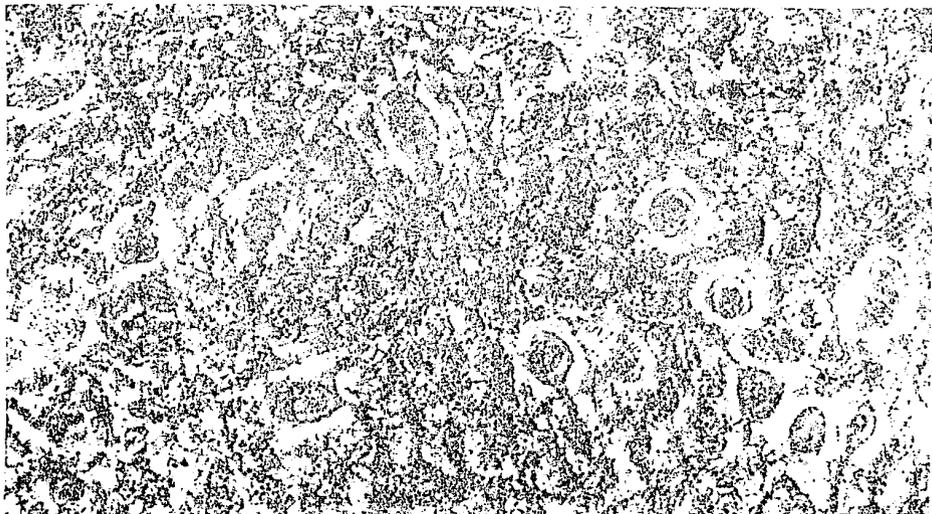


2f

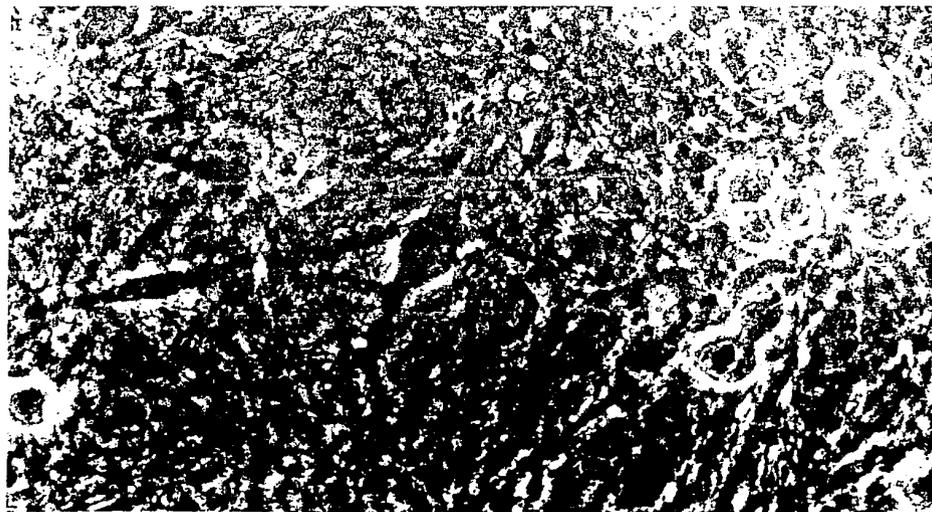
29



2h



2i

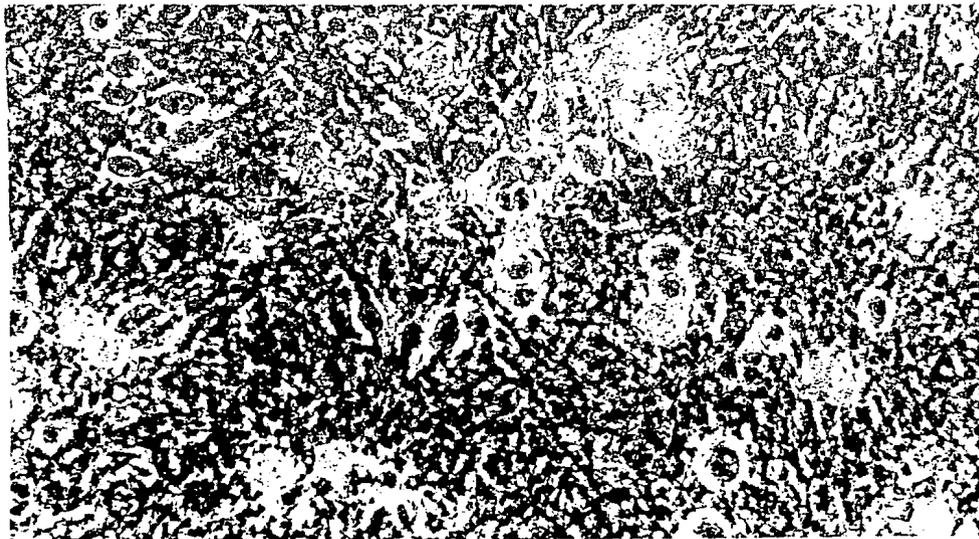


2j

FIGURA 2.3. CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE RATA.

En la figura se muestra un cultivo de 20 días de incubación in vitro (E17 + 20) hecho por el procedimiento de dispersión enzimática descrito en METODOS. La cantidad de RNA total fue alrededor de 20 ug por plato y, la cantidad de TRH de un cultivo similar (20 días de incubación in vitro) fue alrededor de 500 pg por plato.

FIGURA No. 3



CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE HIPOTALAMO DE CEREBRO DE RATA.

FIGURA 2.4. EXPRESION DEL RNAm DE TRH A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION IN VITRO. A cultivos tomados a diferentes días de incubación in vitro (E17 + 7, +14, +21) se les hizo la extracción de RNAtotal y se determinó el RNAm TRHérgico por análisis de Northern (ver METODOS). Los resultados sugirieron un incremento de la expresión del RNAm TRH conforme transcurren los días de incubación in vitro, siendo más marcado entre los 7 y 14. Se muestran los histogramas de 4 experimentos individuales (figura 8.a.-figura en la parte superior de la siguiente hoja- , 3 experimentos individuales; figura 8.b.-figura en la parte inferior de la siguiente hoja- 1 experimento individual: No. de barra: 1, E17 + 7; 2, E17 + 14; 3, E17 + 21) que nos indican el ascenso en la expresión del RNAm conforme transcurren los días de incubación in vitro.

EXPRESION DEL RNAm DE TRH A DIFERENTES DIAS DE INCUBACION IN VITRO

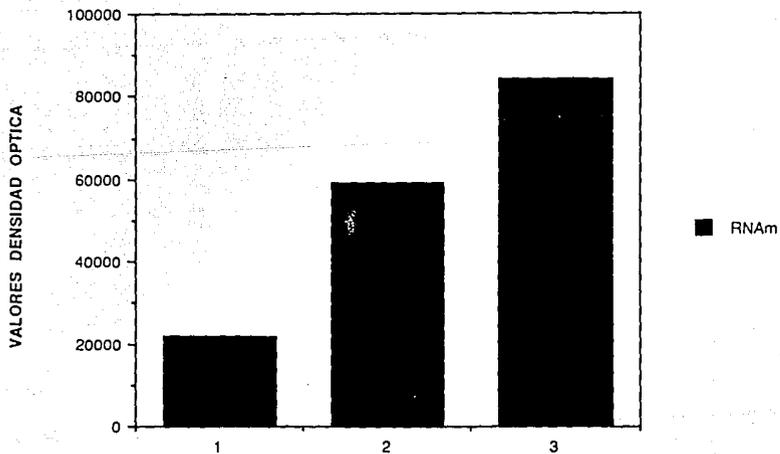
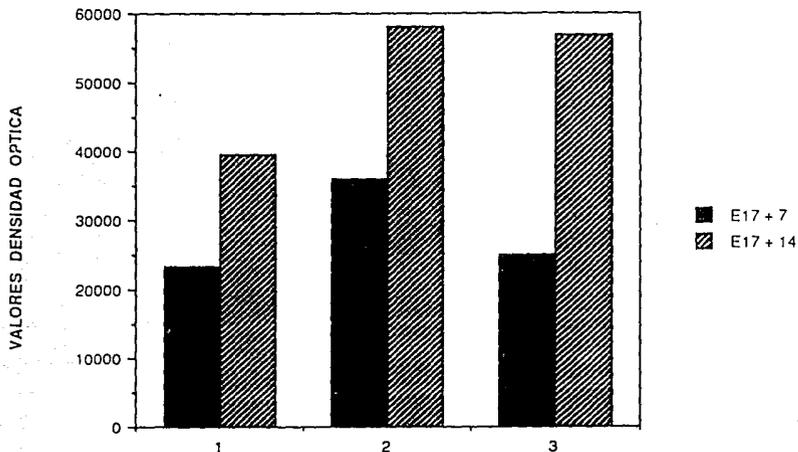


FIGURA 2.5. EFECTO DE 8-BROMO-AMPC 1mM SOBRE LA EXPRESION DEL RNAm DE TRH. Cultivos tomados entre 18 y 23 días in vitro fueron incubados con 8-bromo-AMPC 1mM por 24 horas. Se presenta el promedio de 5 experimentos independientes, observándose un incremento del 100% en la expresión del RNAm de TRH por efecto de la droga. Los valores están normalizados en relación al RNAtotal de cada una de las muestras. El análisis estadístico se hizo por prueba t (control 100 + 7.2; experimental, 243 + 14. p 0.001) También se muestra un análisis de Northern de 3 experimentos individuales con 8-bromo-AMPC 1mM. Número de carril: 1, control; 2, 8-bromo-AMPC; 3, control; 4, 8-bromo-AMPC; 8, control; 9, 8-bromo-AMPC; 5,6,7, RNAm de TRH de hipotálamo de animal adulto.

EFFECTO DE 8-BROMO-AMPc 1mM SOBRE LA EXPRESION DEL RNAm DE TRH

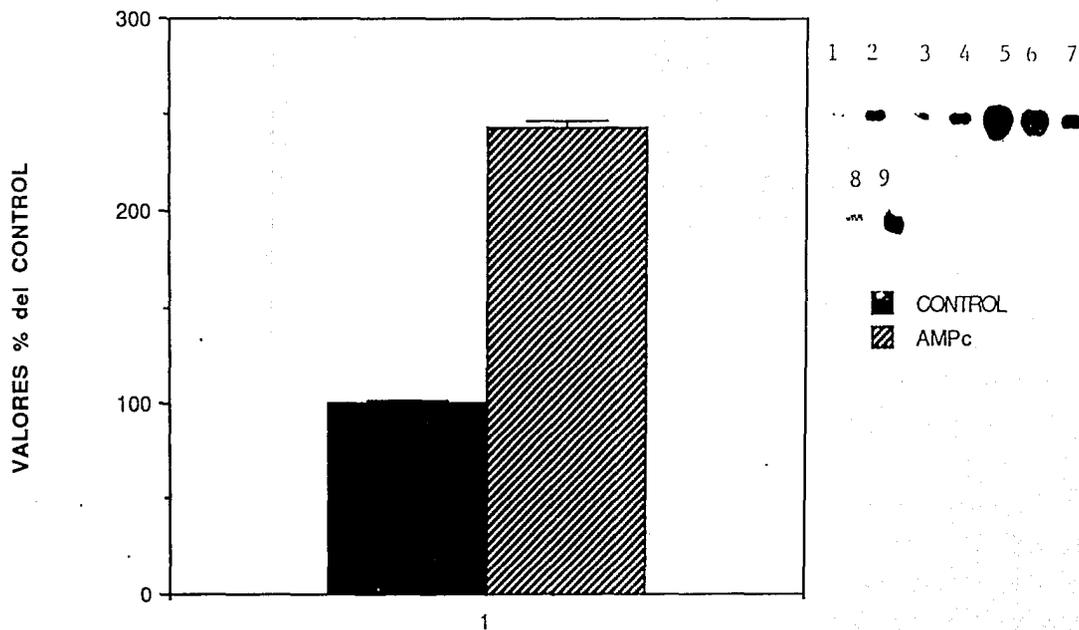


FIGURA 2.6. EFECTO DE FORSKOLINA, ACTIVADOR DE LA ADENILATO CICLASA, SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE TRH. Cultivos tomados entre 18 y 23 días in vitro fueron incubados con forskolina 20uM por 24 horas. Se muestra un incremento de 4 veces en los niveles de RNAm de TRH en relación al control, por efecto de la droga. Los histogramas muestran el resultado de 2 experimentos individuales. También se muestra un análisis de Northern de 2 experimentos individuales con forskolina 20uM. Número de carril: 1, control; 2, forskolina; 3, control; 4, forskolina.

EFFECTO DE FORSKOLINA, ACTIVADOR DE LA ADENILATO CICLASA, SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE TRH

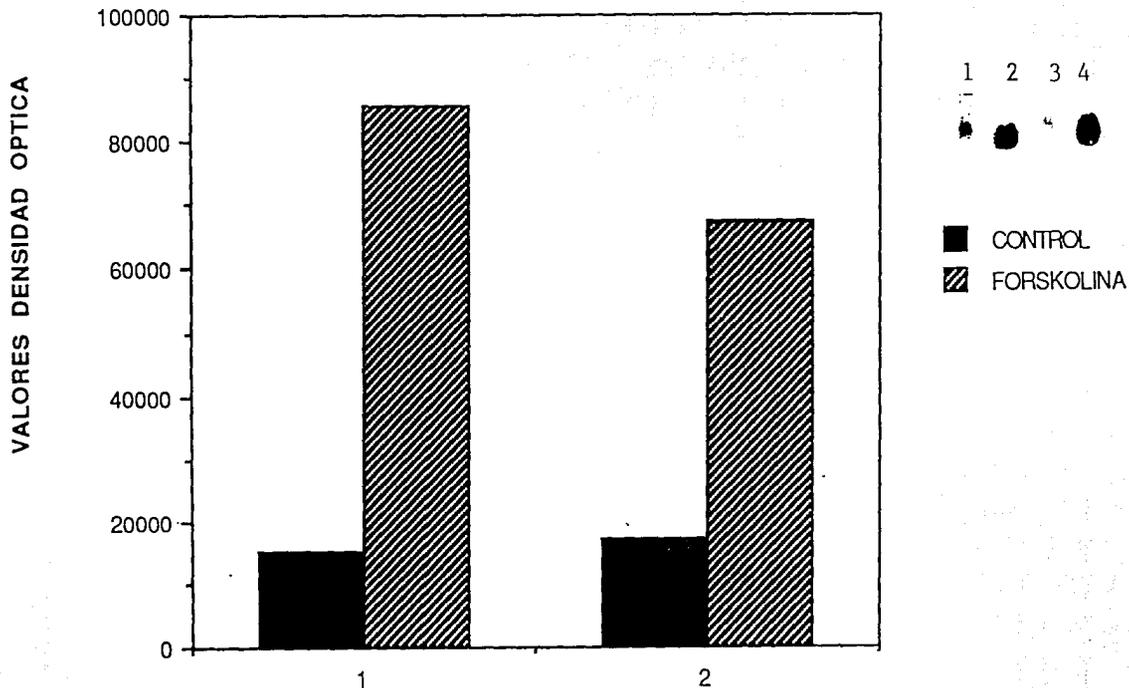
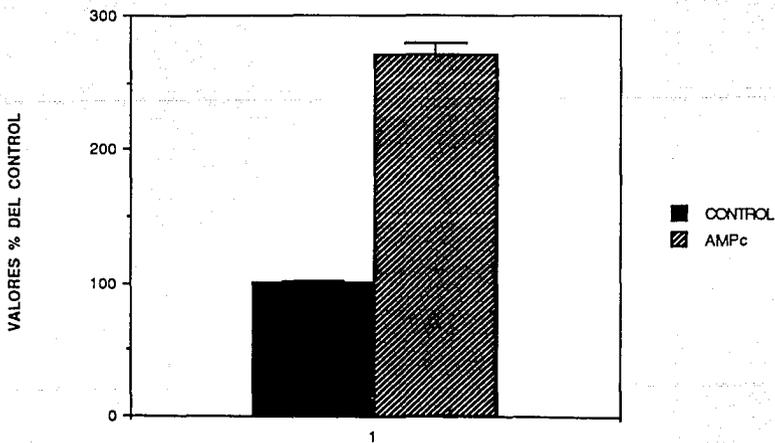
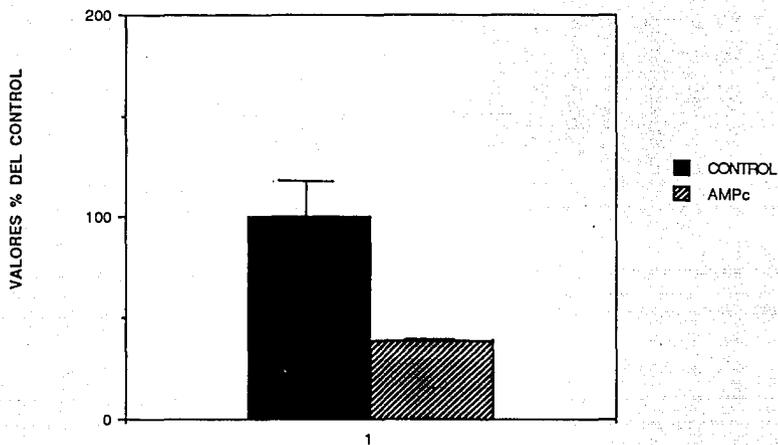


FIGURA 2.7. EFECTO DEL 8-BROMO-AMPC 1mM SOBRE LA CANTIDAD DE TRH INTRACELULAR Y EL PEPTIDO LIBERADO. Cultivos tomados entre 18 y 23 días in vitro fueron incubados con 8-bromo-AMPC 1mM por 24 horas. En la figura 7.A. (figura en la parte superior de la siguiente hoja) se muestra el promedio de 3 experimentos independientes observándose una disminución de aproximadamente el 50% en relación al control. Los valores están normalizados en relación a la cantidad de proteína total de cada plato.

(control, 88.2 ± 27.7 ; experimental 56.2 ± 2.9)

En la figura 7.B. (figura en la parte inferior de la siguiente hoja) se aprecia el promedio de 5 experimentos independientes observándose un incremento del 100% en relación al control en la cantidad de TRH en el medio. El análisis estadístico se hizo por prueba t (control, 101 ± 11.6 ; experimental 271 ± 30.0 ; $p < 0.001$).

EFFECTO DE 8-BROMO-AMPc 1mM SOBRE
LA CANTIDAD DE TRH INTRACELULAR Y EL
PEPTIDO LIBERADO



DISCUSION.

En este trabajo se ha implementado un sistema in vitro, el cultivo primario de células dispersas de hipotálamo de cerebro de rata. La finalidad principal fue obtener un sistema que simplifique la compleja citoarquitectura de una región del sistema nervioso eliminando aquellas influencias bioquímicas externas que complicarían la interpretación de datos experimentales; p.ej. en el hipotálamo el tejido se aísla de las señales provenientes de la retroalimentación del eje hipotálamo-pituitaria-órgano blanco (p.ej. glándula tiroides). De este modo, las células nerviosas que conforman el hipotálamo pueden ser estudiadas en un ambiente relativamente aislado bajo el efecto de diversos compuestos químicos (p.ej. neurotransmisores, hormonas) permitiendo el estudio de efectores directos y con ello, poder definir si la transmisión nerviosa altera el metabolismo (p. ej biosíntesis de TRH) neuronal. La información que se desprende de este tipo de enfoque que si bien lleva a una interpretación reduccionista en donde la célula, en este caso nerviosa, es un sistema aislado que necesita ser estudiado para ahondar en su funcionamiento (tanto a nivel molecular como celular), también conduce a la obtención de un conjunto de conocimientos que al final dan lugar al entendimiento de lo que ocurre en el organismo completo bajo un estado fisiológico definido (p. ej. la comprensión de las funciones hipofisiotrópicas de TRH hipotalámico)

La mayoría de los estudios que intentan comprender la transmisión de señales en un sistema celular in vitro han utilizado líneas celulares (p.ej. PC12, GH4); sin embargo, si la pregunta de interés intenta comprender a un tipo neuronal (p.ej. neuronas TRHérgicas) el uso de cultivos primarios resulta una buena aproximación ya que se parte del tejido con las características bioquímicas propias en contraposición del uso de líneas celulares que presentan el inconveniente de probablemente no expresar ciertos elementos que intervienen en la transmisión de señales (p. ej. ciertos receptores).

Las células aisladas de hipotálamos fetales son una población heterogénea de células nerviosas y gliales primitivas, células ventriculares (p.ej. ependimocitos) y neuronas madurando con axones (Benda, et.al., 1975) y en donde la identificación neuronal se ha considerado por su excitabilidad eléctrica y potenciales sinápticos (Vaccaro, et.al., 1980 y Faivre-Bauman, et.al., 1980). La naturaleza peptidérgica de algunas de estas neuronas en cultivo se ha demostrado por inmunocitoquímica o por radioinmunoanálisis específico. Varios péptidos se han identificado como son la somatostatina (Zingg, 1982), la hormona que libera la hormona luteinizante -LHRH- (Knigge, et.al. 1977), la beta-endorfina (Lolait, et.al., 1983), la vasopresina y neurofisina (Jerikowski, et.al. 1981). También se ha probado su actividad funcional, p.ej. para la somatostatina, la ACTH y la beta-endorfina, y el CRF (Gansse, et.al., 1980; Peterfreund, et.al. 1982; Kapcala, et.al., 1985; Clarke, 1987, 1988).

También se ha hecho posible el estudio del metabolismo de la neurona TRHérgica utilizando este sistema de células dispersas hipotalámicas. En cultivos de hipotálamo de ratón se ha caracterizado la diferenciación celular así como la presencia inmunológica de TRH y su funcionalidad (Faivre-Bauman, A. et.al., 1980, 1981).

Teniendo en consideración estos antecedentes en el presente trabajo se utilizó el cultivo de células dispersas de hipotálamo de rata. Los cultivos se prepararon a partir de hipotálamos fetales de 18 días de gestación (E17). Se seleccionó esta etapa de desarrollo debido a que, en primer lugar, en rata se ha observado que al 12avo. y 14avo. días de gestación ocurre la división final de todos los núcleos hipotalámicos (Tixier-Vidal, et.al. 1975). Y, en segundo lugar, porque se sabe que en diencéfalo de rata la TRH se puede detectar a partir del 14o. día de gestación (aunque existen discrepancias alrededor de esto, como se verá más adelante) ascendiendo conforme transcurren los días. (Lechan y Jackson, 1982; Nemerski, et.al., 1985)

Bajo las condiciones descritas (ver METODOS) se obtuvieron cultivos primarios con características morfológicas de neurona y glia comparables a reportes anteriores (Benda,

et.al. 1975 y Faivre-Bauman, 1980). Aunque se ha hecho una descripción detallada sobre las características morfológicas de las células que constituyen un cultivo aquí se resalta que en éstos se ha observado, por estudios de microscopia electrónica, la formación de sinapsis. Dicha sinaptogénesis se ha observado después de 10 días de incubación in vitro siendo más rápida o lenta dependiendo de la edad gestacional de los hipotálamos fetales: cuando las células se toman de fetos más viejos (16 y 20 días) las sinapsis son más numerosas después de los 10 días in vitro (Tixier-Vidal, A., et.al. 1975).

Se ha reportado la ontogenia de TRH (Schaeffer y Brownstein, 1980) en diferentes regiones cerebrales (tanto hipotalámicas como extrahipotalámicas) y en cultivos primarios de hipotálamo. En hipotálamo partiendo del 12avo. día de gestación la cantidad de TRH aumenta (siendo más marcada entre el día 12avo y 15avo de gestación) incrementándose hasta el nacimiento (Nemeskeri, A., et.al., 1985). En cultivos, partiendo de hipotálamos fetales de 12 y 15 días de gestación se ha detectado TRH por radioinmunoanálisis observándose que dependiendo de la edad de gestación de los hipotálamos se detecta mayor cantidad de TRH en los cultivos (Faivre-Bauman, A., et.al. 1980).

Aunque se ha estudiado la ontogenia en relación a la expresión del péptido en cultivos primarios no se tienen datos sobre el RNAM de TRH en cultivos primarios de hipotálamo de rata. En este trabajo, partiendo de cultivos preparados a partir de hipotálamos fetales de 18 días de gestación (E17) se ha observado un incremento en los niveles de RNAM de TRH conforme transcurren los días de incubación in vitro (FIGURA 4). Hipotálamos fetales de 18 días de gestación muestran ya completo desarrollo y a esta etapa se ha detectado RNAM TRH (Burgunder, J.M. and Taylor, T, 1989). Las primeras neuronas que expresan el gene de TRH se detectan en el día 14 de gestación en el hipotálamo lateral; en los días 15 y 16 las células que se marcan adicionalmente están en el núcleo dorsomedial y paraventricular respectivamente y, en el día de gestación 17, en el área preóptica. Este punto es importante si consideramos que en este trabajo se desea trabajar con neuronas en un estado de diferenciación lo más completa posible. Por lo antes mencionado se puede pensar que hemos partido de neuronas TRHérgicas que se encuentran en buen estado de diferenciación bioquímica y morfológica y, que en

el momento de utilizar los cultivos para estudiar la regulación de la biosíntesis de TRH -entre 18 y 23 días de incubación in vitro, las células son neuronas en estado maduro.

Los resultados obtenidos en esta tesis están en acuerdo con trabajos sobre la ontogénesis in vitro de otros péptidos (la somatostatina, CRF o vasopresina), en donde también se ha observado un ascenso en la cantidad de péptido conforme transcurren los días de incubación in vitro (Clarke, 1975).

De acuerdo a lo anterior (tanto el desarrollo estructural de los cultivos como la expresión del RNAm de TRH) fue posible considerar a los cultivos desarrollados en esta trabajo como confiables para los propósitos buscados. Esto es, no sólo por las características morfológicas obtenidas y la duración de su viabilidad in vitro sino también porque de manera crítica fue posible detectar suficientes niveles de TRH y su RNAm, lo cual sugirió que se encontraban neuronas TRHérgicas en los cultivos y por lo tanto se podía considerar la pregunta central del trabajo de tesis: la biosíntesis de TRH es afectada por mediadores intracelulares?

EFEECTO DE SEGUNDOS MENSAJEROS SOBRE LA BIOSÍNTESIS DE LA TRH EN CULTIVOS.

La expresión de péptidos (y/o neurotransmisores) en este caso la TRH se ve influenciado por el microambiente de la neurona. La regulación de los niveles de la TRH puede ocurrir en varias etapas: transcripción del gene, el procesamiento del RNAm o su estabilidad, traducción, en los cambios post-traduccionales y/o en su catabolismo.

Como quedó explícito en la introducción, el interés es determinar si la biosíntesis de la TRH se ve regulada en neuronas, enfocándonos en dos aspectos; uno, en comprender si la transmisión nerviosa que afecta los segundos mensajeros, altera los niveles de RNAm TRHérgico y el otro, en la comprensión de los mecanismos intracelulares por los que la neurona TRHérgica modula su actividad metabólica en respuesta a diferentes señales ambientales (implicadas en la transmisión nerviosa).

Apoyando la participación neural en la regulación del metabolismo de la neurona TRHérgica se ha propuesto una regulación diferencial (tanto neuronal como hormonal) sobre la biosíntesis de la TRH en hipotálamo. Las hormonas tiroideas alteran la biosíntesis de TRH en esta región del cerebro (Jackson, I.M.D. and Lechan, M.J., 1983; Segerson, T.P.; Kauer, J. et.al., 1987) pero se sabe que existen otras regiones (p.ej. hipotálamo lateral y el núcleo talámico reticular) que no son afectados por ellas (Koller, K.J., et.al., 1987). Este trabajo no sólo involucra las regiones hipotalámicas que tienen función neuroendócrina (el núcleo paraventricular) sino también a aquéllos otros núcleos que dirigen sus axones a otras regiones del SNC, no involucradas con la función endócrina del TRH.

En este trabajo, nos enfocamos a la regulación del RNAm de TRH, el contenido del péptido y su liberación por 8-bromo-AMPC y forskolina, agentes que activan la proteína cinasa A. Por lo tanto consideramos las vías neurales (a través de receptor membranal) y no las hormonales.

Se ha estudiado la regulación del metabolismo de varios neuropéptidos en cultivos primarios neuronales, por efecto de segundos mensajeros. Entre los trabajos iniciales se encuentra el estudio de la regulación de la biosíntesis de somatostatina por AMPC (Montminy, M.R. et.al., 1986) en donde observan un incremento en los niveles de RNAm del péptido en cultivos diencefálicos por efecto del 8-bromo-AMPC, además de identificar una secuencia nucleotídica en el gene putativo para la regulación de la señal. También se ha estudiado la regulación del CRF -el factor que libera la corticotropina- tanto a nivel de biosíntesis como de liberación por efecto de forskolina y TPA; la secreción del CRF se estimula por forskolina y el 8-bromo-AMPC mientras que tanto el RNAm como el péptido intracelulares se aumentan por efecto de forskolina y TPA (Emmanuel, R.L. et.al., 1990).

Los datos obtenidos en el presente trabajo indican un efecto del AMPC sobre la neurona TRHérgica. El 8-bromo-AMPC incrementó los niveles de RNAm TRH y la liberación de TRH mientras que disminuyó el contenido de TRH intracelular. El decremento en el nivel del péptido (TRH inmunorreactivo) después del tratamiento por 24 horas puede reflejar una liberación incrementada; cuando la liberación se mantiene, debe existir un mecanismo compensatorio que recupere el

contenido intracelular del péptido. Esto se refleja con una acumulación en el RNAm del TRH. Si la liberación es más rápida que la biosíntesis entonces un decremento en el contenido del péptido se observa a pesar de una biosíntesis (transcripción) incrementada. En cuanto el procesamiento debiera ser rápido para compensar la liberación.

Esta puede ser la explicación a nuestros datos ya que el RNAm incrementa el 100% con respecto al control al igual que la liberación pero el contenido de la TRH disminuye en un 50%. Por lo tanto, se puede especular sobre un mecanismo compensatorio necesario para recuperar al péptido que se ha liberado por la presencia de un estímulo ambiental (bioquímico). Esta interpretación está de acuerdo con otros reportes con proencefalina en estriado de rata (Sivam, S.P. and Hong, J.S., 1986) y con POMC en glándula pituitaria (Dreden, G.et.al., 1988)..

Otra etapa susceptible a regulación es el procesamiento de la proteína precursora (pro-TRH). Una de las etapas finales de procesamiento es la conversión de TRH-Gly a TRH por la enzima PAM. Simard, M, et.al. han observado que bajo diferentes estados tiroideos la relación TRH-Gly/TRH se modifica en glándula pituitaria, adrenal, páncreas, próstata y tiroides (Simard, M., et.al., 1989; Simard, M., et.al., 1990). Por lo tanto, no se puede excluir la probabilidad de una regulación a este nivel por vías neurales.

Los datos obtenidos de este trabajo indicaron un aumento del RNAm de TRH por efecto del 8-bromo-AMPC. No se puede aún concluir si los efectos observados están a nivel de la transcripción o de la estabilidad del RNAm de TRH. Estudios de transcripción nuclear permitirían aclarar si el efecto del 8-bromo-AMPC está afectando la transcripción del gene de TRH. Para ejemplificar este aspecto, utilizando análisis de transcripción "run-on" se ha demostrado el efecto del 8-bromo-AMPC sobre la transcripción del gene de tirosina hidroxilasa (Lewis, E., et.al., 1987). Los autores demostraron que la actividad transcripcional del gene se incrementa cuando cultivos (de feocromocitoma, PC12) se tratan con 8-bromo-AMPC

y forskolina. Ambos inductores ocasionan cambios transcripcionales después de 10 minutos de tratamiento. Otros estudios de transcripción nuclear que demuestran el efecto de segundos mensajeros sobre el gene son aquéllos para POMC y tirosina hidroxilasa (Eberwine, et.al., 1987; Lewis, et.al., 1987).

Por los resultados obtenidos en este trabajo, queda claro que el sistema de cultivo de células dispersas de hipotálamo desarrollado ofrece una buena herramienta metodológica con la cual estudiar cuáles son los mediadores intracelulares que afectan la biosíntesis y la liberación de la TRH.

Otra vía de segundos mensajeros que nos faltaría utilizar es la del fosfatidilinositol, la cual activa la proteína cinasa C; para esto se probaría un activador de dicha proteína como es el TPA, éster de forbol. De manera interesante también se considerarían aquéllos factores que ocasionan despolarización en las neuronas, p. ejemplo. KCl 56mM y veratridina. En relación a ésto, sería de interés determinar si están involucrados canales de Na^+ y de Ca^{++} . También cabría determinar si el Ca^{++} intracelular, liberado del retículo endoplásmico rugoso (vía activada también por el fosfatidilinositol), está jugando un papel central en la regulación de la neurona TRHérgica.

La información que se desprende al utilizar la diversidad de segundos mensajeros, acoplados a un receptor, nos permite especular en dos enfoques por los cuales los segundos mensajeros están actuando en una neurona (en este caso la TRHérgica): uno, en donde se considera una interacción entre los segundos mensajeros o el papel central de uno (p.ej. Ca^{++}) para que se origine determinada respuesta y el otro, que sería consecuencia del anterior, involucra la regulación a nivel de la expresión del gene. Si se considera, en primer lugar, este segundo nivel es posible mencionar lo siguiente:

Los segundos mensajeros son mediadores intracelulares que necesitan de secuencias nucleotídicas específicas para regular la transcripción de un gene (Goodman, R.H., 1990; Montminy,

M.R., 1990; Comb, M., et al., 1987). Los trabajos para determinar dichas secuencias consisten en estudios de transfección celular donde se hace un análisis de las posibles secuencias nucleotídicas que intervienen en la regulación de la transcripción de cierto gene (p.ej. el gene de TRH). Se hace una fusión de las posibles secuencias regulatorias del gene de estudio con un gene "reportero" que produce una proteína que se puede analizar fácilmente (p.ej. cloranfenicol acetiltransferasa -CAT-) y el análisis del producto del gene reportero refleja el nivel de expresión génica que es dirigido por la secuencia regulatoria bajo estudio. Por ejemplo en el caso de tirosina hidroxilasa (TH), las secuencias del extremo 5' de su gene se fusionaron al gene bacterial CAT y el gene híbrido se transfirió en líneas celulares PC12 y GH4. Después de esto se observó la expresión del gene bajo efecto de los diferentes inductores (en este caso AMPc y forskolina); los resultados indicaron que la región del gene de TH que contiene las bases -277 a +27 confiere inducción de CAT por AMPc indicando que las secuencias requeridas para la inducción de TH por AMPc están dentro de las 272 bases del extremo 5' (Lewis, et al., 1987). Con el mismo enfoque se han reconocido secuencias que intervienen para que el AMPc regule la transcripción de diferentes genes; p.ej. proencefalina y somatostatina (Montminy, M.R., et al., 1986; Comb, M., et al., 1986, 1988). Utilizando dicha estrategia se han determinado secuencias consenso responsivas para AMPc y TPA siendo éstas TGACGTCa y TGAGTCA respectivamente (Goodman, R.H., 1990). También se han determinado las secuencias consenso responsivas a Ca⁺⁺ siendo similares a las de AMPc por lo que se ha especulado en relación a que pudiesen responder a ambos efectores (Hanley, 1988). Existen ejemplos donde la secuencia determinada no es única para que se lleve a cabo la transcripción: el gene de proencefalina contiene dos elementos funcionalmente distintos designados ENK-CRE1 (TGCGGTA) Y ENK-CRE2 (CGTCA). El elemento CRE-1 tiene poca actividad por sí mismo pero aumenta considerablemente la inducción por AMPc si se combina con el elemento CRE-2 (Comb, M., et al., 1988; Hyman, S.E., 1988).

De manera interesante, en este trabajo se ha observado que el RNAm TRH se estimula por AMPc. Aunque aún se necesita de experimentación adicional (como ya lo expuse anteriormente) me parece pertinente señalar que el gene de TRH no presenta las secuencias consenso que responden a AMPc; por lo tanto, se puede especular en relación al mecanismo por el que el gene

de TRH está respondiendo a AMPc sea diferente a los conocidos, ya sea activando otro factor o que la secuencia nucleotídica sea diferente. Un caso similar es el del gene de POMC el cual también se ha observado que responde a AMPc y no presenta las secuencias definidas para tal inductor (Eberwine, et.al. 1987). Si se desea profundizar sobre cuál sería la secuencia nucleotídica en el gene de TRH que responde a AMPc se podrían realizar estudios de transfección celular como los descritos arriba.

Continuando con los posibles mediadores en la respuesta de la expresión del gene a nivel de la regulación, recientemente se ha estudiado el papel de los protooncogenes nucleares (Hanley, M.R., 1988) y su relación como mediadores de la respuesta a señales extracelulares a través de segundos mensajeros (Morgan, J.I. and Curran, T., 1989; Sheng, M. and Greenberg, M.E., 1990). Los protooncogenes que se han caracterizado en el sistema nervioso incluyen principalmente c-fos, c-jun, zif/268, nur/77, jun-B (para revisión ver, Sheng, M and Greenberg, M.E., 1990). Los más estudiados en el acoplamiento de la cascada estímulo-transcripción son c-fos y c-jun, los cuales se inducen rápida y transitoriamente después de cierta estimulación. Se ha propuesto el mecanismo por medio del cual actúan y se ha determinado el reconocimiento de la secuencia nucleotídica por medio de la cual va a responder, TGACTCA (secuencia consenso para AMPc). De manera general, cierto estímulo extracelular provoca un incremento en los niveles de segundos mensajeros ocasionando la inducción de c-fos y c-jun. Esta activación involucra distintos elementos regulatorios en la región 5' de ambos genes; después de esto continúa su traducción en el citoplasma, Fos y Jun (las proteínas codificadas por c-fos y c-jun respectivamente) viajan al núcleo donde forman un complejo heterodimérico. Este complejo se une con alta afinidad a la secuencia de reconocimiento consenso (TGACTCA) del DNA. De este modo, el heterodimero Fos-Jun es capaz de regular la transcripción de ciertos genes blanco (ya sea inducción o represión).

Especulando sobre un probable mecanismo por medio del cual el AMPc y el TPA están actuando para regular la transcripción del gene TRHérgico, es posible involucrar a los terceros mensajero, c-fos y c-jun. Estudios que directamente apoyan esta interpretación incluyen aquéllos que han observado inducción de Fos y Jun por neurotransmisores y condiciones despolarizantes o agentes que provocan un influjo de Ca⁺⁺ a través de canales de Ca⁺⁺ dependientes de voltaje (Sonnenberg, 1989; Morgan y Curran, 1986). Trabajos iniciales observaron la inducción de Fos por tratamiento con agentes que activan

canales de Ca^{++} dependientes de voltaje en células PC12 (Morgan, J. y Curran, T, 1986), sugiriendo que estos efectos se podrían extrapolar al sistema nervioso. Utilizando un paradigma experimental que consiste en una excitación eléctrica masiva de las neuronas in vivo -"actividad convulsiva"- ocasionado por drogas convulsionantes (p. ej. el pentilene-tetrazol -PTZ-) se determinó un incremento en los niveles de RNAm de c-fos seguido por acumulación de la proteína FOS en regiones cerebrales específicas. Con la misma estrategia se observó el incremento de c-fos en regiones del cerebro particulares como el hipocampo, el locus coeruleus, la amígdala, la corteza temporal (Morgan, J. y Curran, T., 1988).

Con la finalidad de determinar los genes blanco (esto es, genes de ciertos péptidos o proteínas) que activan terceros mensajeros, un primer estudio fue el de Sonnenberg, J. et.al. quienes correlacionaron la expresión del gene de proencefalina en el hipocampo provocado por la actividad convulsiva, con la expresión de c-fos (Sonnenberg, J. L., et.al., 1989). En este trabajo el RNAm de proencefalina se incremento en el hipocampo durante la actividad convulsiva inmediatamente después de que se detectó un incremento en la expresión de c-fos y c-jun, sugiriendo que el gene de proencefalina puede ser blanco de Fos y Jun en el hipocampo e indicó que estos protooncogenes (terceros mensajeros) pueden jugar un papel en las respuestas neurales a la estimulación. De este modo se tiene evidencia de un posible papel de los terceros mensajeros en la regulación de la expresión de neuropéptidos bajo estímulos (dentro de un contexto fisiológico) en el sistema nervioso.

En cultivos, células diferenciadas expresan el gene de c-fos en respuesta a una amplia gama de estímulos incluyendo el factor de crecimiento nervioso, agonistas colinérgicos nicotínicos e influjo de Ca^{++} inducido por despolarización (Greenberg, et.al. 1985, 1986; Morgan y Curran, 1986).

Los mecanismo intracelulares por los que un tipo celular particular responderá a una señal determinada no se definen por una sola cascada de eventos mutuamente exclusivos; esto es, no existe señal-segundo mensajero particular-respuesta celular específica. Se debe pensar que existe una interacción compleja (integración de señales) de eventos donde todos los segundos mensajeros pueden participar (interactuando entre sí) para dar la respuesta apropiada a una señal definida. Existe

lo que se ha denominado mecanismo sinergista (interacción entre dos o más segundos mensajeros). Por ejemplo se ha observado que el Ca^{++} y el AMPc interactúan para activar la transcripción del gene de POMC; el influjo de Ca^{++} a través de canales dependientes de voltaje también induce la expresión del gene de POMC, observándose que la entrada de Ca^{++} puede ejercer un efecto estimulador tónico sobre el RNAm de POMC bajo condiciones basales y puede contribuir al efecto inductor de CRF o el del 8-bromo-AMPc (Dreden, G., et.al., 1988). Profundizando en este evento, se ha observado que el CRF, 8-bromo-AMPc y forskolina causan un incremento en el Ca^{++} citosólico en células AtT20, el cual puede inhibirse por bloqueadores de canales de Ca^{++} específicos (Luini, A. et.al., 1985).

Existen otros casos en donde un sistema de segundos mensajeros influye sobre otro, aunque estos estudios se han hecho en su mayoría en sistemas no neurales. Por ejemplo, se sabe que la proteína cinasa C puede modular la generación de AMPc mediada por receptor en células de ovario: TPA no tuvo efecto sobre la acumulación basal de AMPc pero incrementó la formación de AMPc activado por toxina del cólera y forskolina (Wheeler, M.B. y Veldhuis, J.D., 1989). Otros autores muestran que el TPA produce la fosforilación de la unidad catalítica de adenilato ciclasa purificada de cerebro bovino, sugiriendo que la fosforilación de la unidad catalítica de adenilato ciclasa por proteína cinasa C puede estar involucrada en el aumento de la actividad enzimática inducida por ésteres de forbol; estos resultados proveen de un mecanismo bioquímico potencial para una unión regulatoria entre dos sistemas de señal transmembranal (Yoshimasa, T., et.al., 1987). Profundizando más en estas interacciones se sabe que en la vía donde los ésteres de forbol ocasionan una acumulación de AMPc inducido por forskolina las proteínas G pueden estar involucradas, ya que si se hace un tratamiento con toxina pertussis, se previene el efecto estimulante de los ésteres de forbol en una etapa distal a la activación de la proteína cinasa C. El sustrato de la toxina pertussis puede jugar un papel crítico en el enlace de activación de proteína cinasa C a la producción de AMPc incrementada (Rozengurt, E., et.al., 1987).

Como se mencionó en la introducción, existen otros tipos de efectores, las señales hidrofóbicas que no necesitan de un receptor para traducir la señal al interior de la célula (las hormonas tiroideas y los esteroides como los glucocorticoides y las hormonas sexuales). Dichas hormonas, al igual que las señales mediadas por receptor, poseen un mecanismo por medio del cual puedan activar o reprimir la transcripción de cierto gene; se han reconocido secuencias nucleotídicas responsivas en el DNA para las hormonas tiroideas (Koenig, et.al., 1987) y para los glucocorticoides (Giguere, et.al. 1986),.

Se ha estudiado el papel de las hormonas tiroideas en la regulación de la célula TRHérgica en sistemas in vivo (ver introducción), por lo que cabría la posibilidad de estudiar si T3 -triiodotironina- regula los niveles de RNAM de TRH en los cultivos primarios diseñados en este trabajo. También se han hecho estudios in vivo observando el efecto del stress sobre el metabolismo TRHérgico. En este aspecto, se sabe que la glándula suprarrenal está involucrada y que los glucocorticoides juegan un papel central. Por lo tanto, sería una estrategia por seguir estudiar si la dexametasona, glucocorticoide sintético, tiene influencias sobre el metabolismo TRHérgico en cultivos primarios .

Es importante considerar la interacción de estos efectores hidrofóbicos con aquéllos mediadores acoplados a un receptor. En relación a ésto, se conoce que los glucocorticoides y el AMPc inducen la expresión del gene de tirosina hidroxilasa en células de feocromocitoma (Lewis, E., et.al., 1987). En otro estudio, se ha demostrado una interacción entre ambos tipos de mediadores, usando la proencefalina en células de glioma de rata. Se observó que la dexametasona indujo la expresión del RNAM de proencefalina incrementada por AMPc, indicando una acción sinárgica (Yoshikawa, K y Sabol, S.L., 1986). Este tipo de interacciones se describen ya que podrían estar sucediendo en la neurona TRHérgica y estudios alrededor de esto serían plausibles.

Retomando el efecto de los segundos mensajeros sobre la regulación de la expresión de proteínas, es posible pensar en un efecto sobre el desarrollo del sistema nervioso.

En este sentido se ha reportado el efecto de las vías de Ca⁺⁺, AMPc y proteína cinasa C sobre el crecimiento de neuritas en el sistema nervioso (Dannon, D.H.et.al, 1990; Talkovsky, A.M. et.al., 1990). También se ha propuesto la regulación de

proteínas del citoesqueleto por vías de segundos mensajeros durante el crecimiento de neuritas y como moduladores de la forma y tamaño neuronal (Katayama, N. et. al. m, 1990; Gonda, Y, et. al., 1990). Es posible entonces, apreciar el efecto de los mediadores intracelulares en diversos procesos del sistema nervioso.

Es de esperar y ya se ha demostrado, que los efectos de los segundos mensajeros no sólo se dan en el sistema nervioso sino también en otros sistemas; por ejemplo del sistema inmune (Kasahara, T. et. al., 1990).

Como puede apreciarse, el estudio de la regulación de una célula puede comprenderse bajo dos enfoques: primero, el entendimiento de lo que sucede en una célula aislada que recibe influencias externas teniendo la capacidad de traducir la información para dar la respuesta apropiada (p.ej. modulando la biosíntesis y la liberación de una proteína o proteínas intracelulares) y segundo, el entendimiento de esta regulación bajo un contexto integral. Esto es, las células que responden a un estímulo particular conforman un tejido específico e interactúa con muchos otros tipos celulares que también reciben estímulos. Por lo tanto, la interacción entre estos tipos celulares y sus respuestas definidas originan una respuesta total y organizada. A su vez, el tejido interactúa con otros tejidos para dar una respuesta adecuada en un sistema (p.ej. el sistema neuroendócrino). La interacción entre los sistemas capacita a un organismo completo para organizar las señales externas respondiendo a su ambiente exterior, ocasionando finalmente su adaptación.

En el sistema nervioso, las neuronas reciben estímulos en su microambiente para dar una respuesta adecuada. Sus características propias (morfológicas y de excitabilidad) permiten la recepción, transmisión y almacenamiento de información. Estas características le permiten modificarse conduciendo a un fenómeno plástico que lo lleva a traducir la información apropiadamente. Por otro lado, la interacción que presenta con los otros tipos celulares (neuronales) establecen un complejo para capacitar al sistema nervioso conduciendo a la plasticidad como un todo. Tales proceso de interacción en el sistema nervioso pueden conducir a establecer la respuesta a conductas particulares en el organismo. Se ha demostrado en

.....invertebrados que la expresión de genes en neuronas es crítico para el desarrollo de una facilitación a largo plazo relacionada con el aprendizaje (Montarolo, P.G., et.al., 1990). Por lo tanto, el estudio de como se regula un tipo celular particular puede conducir a la comprensión de las bases moleculares y celulares de procesos biológicos complejos como serian las funciones superiores de los seres vivientes (p.ej. aprendizaje, memoria, inteligencia).

BIBLIOGRAFIA

1. ALBERT, P.R.; NEVE, K.A.; BUNZOW, J.C.; CIVILLI, O.; THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 265 (4): 2098-2104 (1990)
2. BARINAGA, M.; YAMAMOTO, G.; RIVIER, C.; ET.AL. NATURE. 314: 279-281 (1985).
3. BERRIDGE, M.J. AND ATLAS OF SCIENCE: PHARMACOLOGY. PP. 91-97 (1987).
4. BERRIDGE, M.J. AND IRVINE, R. F. NATURE. 312: 315-320 (1984).
5. BENDA, P.; DEVITRY, F.; PICART, R. Y TIXIER-VIDAL, A. EXP. BRAIN. RES. 23: 29-47 (1975)
6. BOLER, J. ET.AL. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 37: 705-710 (1969).
7. BOWERS, C.Y.. ENDOCRINOLOGY. 81: 741-747 (1967)
8. BROWNSTEIN, M. J. ET.AL. SCIENCE. 185: 267-269 (1974).
9. BURGUNDER, J. M. Y TAYLOR, T. NEUROENDOCRINOLOGY 49: 631-640 (1989).
- 10.. BUSBY, W.H.; QUACKENBUSH, G. E.; HUMM, J.; YOUNGBLOOD, W. W. Y KISER, J. S. THE JOURNAL BIOL. CHEM. 262: 8532-8535 (1987).
11. CLARKE, M. J. O. Y GILLIES, G. E. J. ENDOCRI. 116: 349-356 (1988).
12. CLARKE, M. J. O.; LOWRY, P. Y GILLIES, G. NEUROENDOCRINOLOGY. 46: 147-154 (1987).

13. COMB, M.; BURNBERG, N. C.; SEASHOTZ, A.; HERBERT, E.; GOODMAN, H. M. NATURE 323: 353-355 (1986).
14. COMB, M.; HYMAN, S. E. Y GOODMAN, H. M. TINS 13(5): 473-478 (1987).
15. COMB, M.; MERMOD, N.; HYMAN, S. E.; PEARLBERG, J.; ROSS, M. E.; GOODMAN, H. EMBO JOURNAL. 7: 3793-3805 (1988).
16. COTE, T. E.; FELDER, R.; KEBABIAN, J. W.; SEKURA, R. D.; REISINE, T. Y AFFLTER, H-U. THE JOURNAL OF BIOL CHEM. 261(10): 4551- 4561 (1986).
17. CREBA, J. A. Y KAROBATH, M. BIOCHEM. PBIOPHYS. RES. COMMUN. 139: 581-589 (1986)
18. CURRAN, T. AND ROBERT, B. F. CELL. 55: 395-397 (1988).
19. CHAD, J.E. Y ECKERT, R. (1986). J. PHYSIOL (LONDON). 378: 31-51.
20. CHEUNG, W. Y. SCIENCE. 207: 19-27 (1980)
21. DANNON, D.H.; D'AMORE, P. A. Y WAGNER, J. A. JOURNAL OF CELL BIOL. 110: 1333-1339 (1990).
22. DAUTRY-VARSAT, A AND LODISH, H. T. TINS. 484-490 (1983).
23. DOCHERTY, K. AND STEINER, D. F. AM. REV PHYPIOL. 44, 625-638 (1982).
24. DOLPHIN, A. C. TINS. FEBRUARY (10). 53-56 (1987).
25. DREDEN. G.; LOEFFLER, J.P.; GRIMM, C. ET.AL. NEUROENDOCRINOLOGY. 47: 32-37 (1988).
26. DUNLAP, K.; HOLZ, G. AND RENE, S. G. TINS 10 (6): 241-244 (1987).

27. EBERWINE, J. H.; JONASSEN, J. A.; EVINGER, M. J. W. Y ROBERTS, J. L. DNA. 6(5): 483-492 (1987)
28. EIPPER., B. A. Y MAINS, R. E. ENDOCR. REV. 1: 1 (1982).
29. EIPPER, B. A.; PARK, L. P.; DICKERSON, I. M.; KEUTMANN, H. T.; ET.AL. MOL. ENDOCRINOL. 1: 777-785 (1987).
30. EMMANUEL, R. L.; GIRARD, D. M.; THULL, D. L. Y MAJZOUB, J. A. ENDOCRINOLOGY. 126(6): 3016-3021 (1990).
31. ENGLER, D.; CHAD, D. Y JACKSON, I. M. D. ET.AL. J. BIOL. CHEM. 263: 620-623 (1988).
32. FAIVRE-BAUMAN, A.; NEMESKERI, A.; TOUGARD, C.; TIXIER-VIDAL, A. BRAIN. RES. 185: 289-304 (1980).
33. FAIVRE-BAUMAN, A.; ROSENBAUM, E.; PUYMIRAT, J.; ET.,AL. DEV. NEUROSCI. 4: 118-129 (1981).
34. FAUCON, N. BREDA, M. S.; LOMOUROUX, A.; SOMOLYK, A. AND MALLET, J. THE EMBO JOURNAL. 5 (2): 287-291 (1986).
35. FINDLAY, J. B. C. AND PAPPIN, D. J. C. BIOCHEM. J. 238, 625-642 (1986).
36. FRIEDMAN, W. J.; DREYFUS, C. F. McEWEN, B. Y BLACK, I. B. MOLECULAR BRAIN RESEARCH. 3: 203-206 (1988).
37. FUKUDA, H. ENDOCRINOLOGY. 97: 924-931 (1975).
38. GAMSE, R.; VACCARO, D. E.; GAMSE, G.; ET.AL. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 77: 5552-5556 (1980).
39. GARBER, S.L. Y MAKMAN, M.H. MOLECULAR BRAIN RESEARCH. 3: 1-10 (1987).
40. GIGUERE, U.; HOLLENBERG, S.M.; ROSENFELD, M.G. Y EVANS, R.M. CELL. 46: 645-652 (1986).

41. GLEMBOTSKI, C. C.; MANAKER, S.; WINKOUR, A. Y GIBSON, T. R. THE JOURNAL OF NEUROSCI. 6(6): 1796-1802
42. GONDA, Y.; NISHIZAKAWA, K.; ANDO, S.; KITAMURA, S. ET.AL. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 167(3): 1316-1325 (1990).
43. GOODMAN, R. H. ANNU. REV. NEUROSCI. 13: 111-127 (1990).
44. GREENBERG, M. E.; GREENE, C. A.; ZIFF, E. B. J. BIOL CHEM. 260: 14101-14109 (1985).
45. GREENBERG, M.E.; ZIFF, E.B.; GREENE, C. A. SCIENCE. 234: 80-82 (1986).
46. GREENGARD, P. MOLECULAR NEUROBIOLOGY 1: 81-119 (1987).
47. GUILLEMIN, R. ET.AL. ENDOCRINOLOGY. 73: 564-572 (1963).
48. GREEN, J. D. AND HARRIS, G. W. ENDOCRINOLOGY. 5: 136-146 (1947).
49. GRIMM, Y. Y REICHLIN, S. ENDOCRINOLOGY. 93: 626-631 (1973).
50. GRIMM-JORGENSEN, Y. Y MCKELVY, J.F. ENDOCRINOLOGY. 93, 626-631 (1974)
51. HANLEY, M. R. NEURON 1: 175-182 (1988).
52. HESCHELER, J.; ROSENTHAL, W.; TRAUNTIVEIN, W. AND SCHULTZ, G. NATURE 325: 445-447 (1987).

53. HOKFELT, T. ET.AL. EUR. J. PHARMACOL. 34: 389-392 (1975).
54. HOOK, V.Y. H. CELLULAR AND MOLECULAR NEUROBIOL. 8(1): 49-55 (1988)
55. HUANG, K-P. TINS 12(11): 425-431 (1989).
56. HUTTNER, W. B. ANNU. REV. PHYSIOL. 50. 363-376 (1988).
57. HYMAN, S. E.; COMB, M.; LIN, Y-S.; ET.AL. MOL. CELL. BIOL. 8: 4225-4233 (1988).
58. IMAGAWA, M.; CHIU, R. AND KARIN, M. CELL. 51, 251-260 (1987).
59. INSEL, P. A. ET. AL. SCIENCE 190, 896 (1975).
60. JELSEMA, C. L. AND OXEBROD, J. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 84, 3623-3627 (1987).
61. JIRIKOWSKI, G.; REISERT, I.; PILGRIM, CL.H. NEUROSCIENCE. 6: 1953-1960 (1981).
62. JOH, T. H.; GEGHMAN, C. Y REIS, D. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 70: 2767-2771 (1973).
63. JOSEPH-BRAVO, P. ET.AL. ENDOCRINOLOGY. 104: 801-806 (1979).
64. KACZMAKERK, L.K. TRENDS. NEUROSCI. 10: 30-34 (1987).
65. KAPCALA, L. P. GRIFFFIN, T. A.; BIRK, T. M. PEPTIDES 6: 1-4 (1985).

66. KATADA, T.; NORTHUP, J. K.; BOKOCH, G. M.; UI, M. ET. AL. J. BIOL. CHEM. 259, 3578-3585 (1984).
67. KAWANO, H.; DAIKOKU, S. Y SATO, S. E. ENDOCRINOLOGY 112: 951-955 (1983).
68. KENNEDY, M. B. TRENDS IN NEUROSCIENCES. 12 (11): 417-420 (1989).
69. KLEE, C.B. ANNU. REV. BIOCHEM. 49: 489-515 (1980).
70. KLEY, N.; LOEFFLER, J. Ph.; PITTUIS, C. W. AND, HOLLT, V. THE EMBO JOURNAL. 5 (5): 967-970. (1986).
71. KLEY, N.; LOEFFER, J. P. AND HOLLT, V. NEUROENDOCRINOLOGY. 46: 89-92 1987.
72. KOENIG, R. J.; BRENT, G.; WARNE, R. ET.AL. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 84: 5670-5674 (1987).
73. KRIEGER, D. THE HYPOTHALAMUS AND NEUROENDOCRINOLOGY.
74. KNIGGE, K. M.; HOFFMAN, G.; SOCTT, D. E. ET.AL. BRAIN. RES. 120: 393-405 (1977).
75. KOBILKA, B. K.; KOBILKA, T. S.; DANIEL, K.; ET. AL. SCIENCE 240, 1310-1316 (1988).
76. KOLLER, K. J.; WOLFF, R. S.; WARDEN, M. K. Y ZOELLER, R. T. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 84: 7329-7333 (1987).
77. KURACHI, Y.; ITO, H.; SUGIMOTO, T.; SHIMIZU, T. ET. AL. NATURE 337, 555-557 (1989).

78. LA GAMMA, E. F. AND BLACK, I. B. MOLECULAR BRAIN RES. 5: 17-22 (1989).
79. LA GAMMA, E. F.; WHITE, J. D.; ADLER, J. E.; KRAUSE, J. E.; McKELVY, J.F. AND FLACK, I. F. PROC NATL. ACAD. SCI. USA 82: 8252-8255 (1985)
80. LAVERRIERE, J. N.; TIXIER-VIDAL, A.; BUISSON, N.; MORRIN, A.; ET.AL. ENDOCRINOLOGY. 122(1): 333-340 (1988).
81. LECHAN, R. M. Y JACKSON, I. M. D. ENDOCRINOLOGY 111: 55-65 (1983).
82. LECHAN, R. M.; WU, P.; JACKSON, I. M. D.; WOLF, H.; ET.AL. SCIENCE. 231: 159-163 (1986).
83. LECHAN, R. M. Y JACKSON, I. M. D. ENDOCRINOLOGY. 111: 55-65 (1982).
84. LEPAGE-LEZIN, A.; JOSEPH-BRAVO, P.; DEVILLIERS, G. ET.AL. THE JOURNAL OF BIOL. CHEM. 266(3): 1679-1688 (1991).
85. LEWIS, B. M.; DIEGUEZ, C.; LEWIS, M. D. Y SCANLON, M. F. J. ENDOCRINOLOGY 115: 419-424 (1987).
86. LEWIS, M. D.; FOORD, S. M. Y SCANLON, M. F. J. ENDOCRINOLOGY. 115: 255-262 (1987).
87. LEWIS, E. J.; HARRINGTON, C. A. Y CHIKARAISHI, D. M. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 84: 3550-3554 (1987).
88. LEWIS, E. J.; TANK, W.; WEINER, N. Y CHIKARAISHI, D. M. THE JOURNAL OF BIOL. CHEM. 258(23): 14632-14636 (1983)

89. LIBERT, F.; PARMENTIER, M.; LIFOST, A. ET. AL. SCIENCE 244, 569-572 (1989).
90. LIOTTA, A. S.; GILDERSLEEVE, D.; BROWNSTEIN, M. J. Y KRIEGER, E. T. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 76: 1448- 1452 (1979).
91. LOLAIT, S. J.; LIM, A. T.; DAHL, D.; ET. AL. NEUROENDOCRINOLOGY. 37: 111-116 (1983).
92. LOOSFELT, H.; MISHASHI, M.; ATGER, M.; SALESSE, R., ET. AL. SCIENCE 245: 525-528 (1989).
93. LOUDES, C; BARRET, A.; TIXIER-VIDAL, A. Y FAIVRE-BAUMAN, A. NEUROCHEM. INT. 14(1): 35-41 (1989).
94. LOUDES, C.; FAIVRE-BAUMAN, A; PATTE, C Y TIXIER-VIDAL, A. BRAIN RES. 456: 324-332 (1988).
95. LUINI, A.; LEWIS, D.; GUILD, S. ET. AL. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 82: 8034-8038 (1985).
96. MAEDA, K. Y FROHMAN, L. A. ENDOCRINOLOGY. 106: 1837-1841 (1980).
97. MAINS, R. E.; EIPPER, B. A.; GLEMBOTSKI, C. C. AND DORIS, R. M. TINS. JUNE. 229-235 (1983).
98. MENDEZ, M.; JOSEPH-BRAVO, P. CISNEROS, M. ET. AL. PEPTIDES. 8: 291-298 (1987).
99. MCKELVY, M. IN HYPOTHALAMIC PEPTIDE HORMONE AND PITUITARY REGULATION (J. I. PORTER, ED). PLENUM PRESS. NEW YORK. PP. 77-98 (1977).

100. MILLINGTON, W. R.; O'DONOHUE, T. L.; CHAPELL, M. C.; ROBERTS, J. L. Y MUELLER, G. P. ENDOCRINOLOGY. 118(5): 2024-2033 (1986).
101. MONTMINY, M.R.; GONZALEZ, G.A.; YAMAMOTO, K. K. TINS 13(5): 184-188 (1990).
102. MORGAN, J. I. AND CURRAN, T. NATURE. 322: 552-555 (1986).
103. MORGAN, J. I. AND CURRAN, J. CELL CALCIUM. 9: 303-311 (1988).
104. MORGAN, J. I. Y CURRAN, T. TINS. 12(11): 459-462 (1989).
105. MONTMINY, M. R.; LOW, M. J.; TAPIA-ARANCIBA, L.; REICHLIN, S.; ET.AL. J. NEUROSCI, 6: 1171-1176 (1986).
106. MORRIS, B. J.; FEASEY, K. J.; BRUGGINCATE, G.; HERZ, A. AND HOLLT, V. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 85: 3226-3230 (1988).
107. MURDOCH, G. H. ET. AL. NATURE: 300, 192 (1982).
108. MURDOCH, G. H. ET. AL. J. BIOL. CHEM. 258, 15329 (1983).
109. NAOR, Z. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 167 (3): 982-992 (1990).
110. NEGRO-VILAR, A.; OJEDA. S.R. Y McCANN, S. M. ENDOCRINOLOGY. 104: 1749-1752 (1979).
111. NEMESKERI, A.; GROUSELLE, D.; FAIVRE-BAUMAN, A. Y TIXIER-VIDAL, A. NEUROSCI. LETT. 53: 279-284 (1985).

112. NISHIZUKA, Y. SCIENCE. 233: 306-312 (1986).
113. NUNEZ, J. THYROID HORMONES. IN HANDBOOK OF NEUROCHEMISTRY (ABEL LAJTHA EDS.). NEW YORK Y LONDON. VOL. 8. pp.1-23 (1985).
114. PARMENTIER, M.; LIBERT, F.; MAENHAUT, C.; LEFOST, A. ET. AL. SCIENCE. 246, 1620-1625 (1989).
115. PASTAN, I. CYCLIC AMP. SCIENTIFIC AMERICAN. 227 (2): 97-105 (1972).
116. PEKARY, A. E.; KNOBLE, M.; GARCIA, N. H.; BHASIN, G. S. Y HERSHMAN, J. M. JOURNAL OF ENDOCRINOL. 125: 263-270 (1990).
117. PEKARY, A. E.; MEYER, N. V.; VAILLANT, C. Y HERSHMAN, J. M. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. 95: 993-1000 (1980).
118. PETERFREUND, R. A.; VALE, W. BRAIN. RES. 239: 463-477 (1982).
119. REICHLIN, S. ACTA ENDOCRINOL. 276: 21-33 (1986).
120. REICHLIN, S.; MARTIN, J. B.; JACKSON, I. M. D.. IN THE ENDOCRINE HYPOTHALAMUS (JEFFCOATE, S. L. AND HUTCHISON, J. S. M. EDS.). ACADEMIC PRESS, ORLANCO, FL. PP. 230 (1978).
121. ROBBINS, R. J.; LEIDY, J. W. Y LANDON, R. M. ENDOCRINOLOGY. 117: 538-543 (1985).
122. ROSS, E.M. Y GILMAN, A.G. ANNU. REV. BIOCHEM. 49, 533-564 (1980).

123. RHOlam, M.; NICOLAS, P. AND CHOEN, P. FEBS. LETT. 207, 1-5 (1986).
124. ROBERTS, J. L.; EBERWINE, J. H. Y GEE, C. E. SYMP. QUANT. BIOL. 84: 385-391 (1983).
125. ROMANO, G. J.; SHEMSS, B. D.; HARLAN, R. E. HOWELLS, R. D. AND PAFF, D. W. MOLECULAR BRAIN RES. 2, 33-41 (1987).
126. ROSS, E. M. NEURON. 3: 141-152 (1989).
127. ROZENGURT, E.; MURRAY, M.; ZACHARY, I. Y COLLINS, M. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. 84: 2282-2286 (1987).
128. RUBENSTEIN, R. C.; WONG, S. K. F. AND ROSS. E. M. J. BIOL. CHEM. 262: 16 655-16 662 (1987).
129. SCHAEFFER, J. M.; AXELROS, J. Y BROWNSTEIN, M. J. BRAIN. RES. 138: 571-575 (1977).
130. SCHAEFFER, J. M. Y BROWNSTEIN, M. J. BRAIN. RES. 182: 207-210 (1980).
131. SCHALLY, A.V.; REDDING, T.W.; ET.AL. J. BIOL. CHEM. 2440: 4077 (1969).
132. SHENG, M. Y GREENBERG, M. E. NEURON. 4: 477-485 (1990).
133. SEGERSON, T. P.; KAUER, J.; WOLFE, H. C.; MOBTAKER, H.; ET.AL. SCIENCE. 238: 78-80
134. SEVARINO, K. A.; WU, P.; JACKSON, I. M. D. JOURNAL OF CLIN. INVEST. 69: 1310-1320 (1982)
135. SIEGEL, R. E.; EIDEN, L. E. Y AFFOTTER, H-U. NEUROPEPTIDES 6: 543-552 (1985).

136. SHIMIZU, T. AND WOLFE, L. S. JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY. 55 (1): 1-11 (1990).
137. SHIOMI, H.; WATSON, S. J.; KELSEY, J. E. Y ABEL, H. ENDOCRINOLOGY. 119(4): 1793-1799 (1986).
138. SIMANTOV, R. AND SACHS, L. J. BIOL. CHEM. 250, 3236 (1975).
139. SIMARD, M.; PEKARY, E.; SMITH, V. P. Y HERSHMAN, J. M. PEPTIDES. 10: 145-155 (1989).
140. SIMARD, M.; PEKARY, A. E.; SMITH V. P. Y HERSMAN, J. M. ENDOCRINOLOGY. 125(1): 524-531 (1989).
141. SIVAM, S. P. AND DONG, J-S. THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS. 237 (1): 326-331 (1986).
142. SONNENBERG, J. L. J. NEUROSCI. RES. 24(1): 72-80 (1989A).
143. SONNENBERG, J. L.; RAUSCHER, F. J.; MORGAN, J. I. Y CURRAN, T. SCIENCE. 246: 1622-1625 (1989B).
144. SOSSIN, W.S.; FISHER, J.M. Y SCHELLER, R.H. NEURON 2: 1407-1417 (1989).
145. SNYDER, D. H. SCIENTIFIC AMERICAN. OCTOBER: 132-141 (1985).
146. SPIEGEL, K. MOLECULAR BRAIN RES. 5: 23-29 (1989).
147. STRONG, J. A.; FOX, A. P.; TSIEN, R. W.; KACZMAREK, L. K. NATURE 325: 714-717 (1987).
148. SUGANO, K.; PARK, J.; SOLL, A.; YAMADA, T. AM. J. PHYSIOL. G686-689 (1986).

149. SIEGEL, R. E.; EDEN, L. E. AND AFFOLTER, H. U. NEUROPEPTIDES. 6: 543-552 (1985).
150. TALKOVSKY, A. M.; WALKER, A. E.; MURRELL, R. D. Y LSUIDAN, H. S. THE JOURNAL OF CELL BIOL. 110:1295-1306 (1990).
151. VACCARO, D. E.; LEEMAN, S. E.; MESSER, A. J. NEUROBIOL. 11: 417-424 (1980).
152. VERMES, I.; TILDERS, F. J. H. Y STOOF, J. C. BRAIN. RES, 326: 41-46 (1985).
153. WALTER, P. AND BLOBEL, G. J. CELL BIOL. 91, 551-556 (1981).
154. WATERMAN, M.; MURDOCH, G. H.; EVANS, R. M.; ROSENFELD, M. G. SCIENCE. 229: 267-269 (1985).
155. WHEELER, M. B. Y VERHUIS, J. D. ENDOCRINOLOGY 125 (5): 2414-2420 (1989).
156. WILCOX, J. N. Y ROBERTS, J. L. ENDOCRINOLOGY. 117 (6): 2392-2396 (1985).
157. YAMADA, M. Y WILBER, J. F. NEUROPEPTIDES. 15: 49-53 (1990)
158. YATANI, A.; IMOTO, Y., CADENA, J. ET. AL. J. BIOL. CHEM. 163 (20): 9887-9895 (1988).
159. YOSHIKAWA, K. AND SABOL, S. L. MOLECULAR BRAIN RES. 1, 75-83 (1986).
160. YOSHIMASA, T.; SIBLEY, D. R.; BOUVIER, M.; ET.AL. NATURE. 327: 67-70 (1987).
161. ZINGG, K. M. Y PATEL, Y. C. JOURNAL. CLIN. INVEST. 70: 1101-1109 (1982).