Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Estudio de la regulación transcripcional y funcional del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central de ratones transgénicos

Young, Juan I.

1998

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Young, Juan I.. (1998). Estudio de la regulación transcripcional y funcional del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central de ratones transgénicos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3007_Young.pdf

Cita tipo Chicago:
Young, Juan I.. "Estudio de la regulación transcripcional y funcional del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central de ratones transgénicos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1998.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3007_Young.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y FUNCIONAL DEL GEN DE PROOPIOMELANOCORTINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATONES TRANSGÉNICOS

Juan I. Young

Tesis para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Marcelo Rubinstein

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN INGENIERIA GENETICA Y BIOLOGIA MOLECULAR (CONICET-UBA)

Año 1998

RESUMEN

El gen de proopiomelanocortina (POMC) se expresa en un grupo de neuronas hipotalámicas, en otras del tallo encefálico y en melanotrofos y corticotrofos hipofisarios. La expresión en cada uno de estos grupos está controlada por distintas secuencias regulatorias. Para estudiar la regulación transcripcional de POMC en neuronas hemos producido una serie de ratones transgénicos conteniendo regiones flanqueantes de este gen. Los resultados obtenidos indican que secuencias 5' distales del gen de POMC dirigen la expresión al sistema nervioso central de ratones transgénicos bajo un control temporal y espacial preciso. Las neuronas de POMC liberan β-endorfina (β-EP), un péptido opioide endógeno al que le han sido atribuidas una gran cantidad de funciones. Para determinar más precisamente la contribución de β-EP a respuestas opioides, se utilizaron ratones deficientes en este péptido. Los estudios se dirigieron a investigar la participación de la β-EP en los mecanismos de control del peso corporal y la relación existente entre este neuropéptido y el consumo de alcohol. Observamos que los ratones deficientes en β-endorfina (β-EP -/-) alcanzan luego de la pubertad un mayor peso corporal que sus hermanos normales, y esto se debería, en parte, a una alteración en la liberación de oxitocina que genera un aumento en la liberación de leche. Investigamos la respuesta de los ratones β-EP -/- al etanol analizando el efecto de la droga sobre la locomoción horizontal y la coordinación motora. El análisis de los resultados mostró una marcada diferencia en la respuesta al etanol, indicando la participación del sistema endorfinérgico en esta respuesta.

INDICE

Introducción	página 1
Objetivos	página 2
Materiales y Métodos	página 34
Resultados y Discusión	página 47
Referencias	página 102

INTRODUCCION

1. POMC

El gen de proopiomelanocortina (POMC) codifica para un precursor multipeptídico que a través de un complejo procesamiento posttraduccional tejido específico da lugar a una variedad de hormonas y neuropéptidos entre los cuales se encuentra la hormona adenocorticotrófica (ACTH), la hormona estimulante de los melanocitos (α–MSH), β-lipotrofina (β-LPH), las formas opioides y no opioides de ß-endorfina y los péptidos N-terminales N-POMC$_{1-49}$ y γ-MSH (Civelli *et al.*, 1982) (figura). El nombre de esta prohormona deriva entonces de la actividad opioide de la β-endorfina, melanocítica de α–MSH y corticotrófica de ACTH.

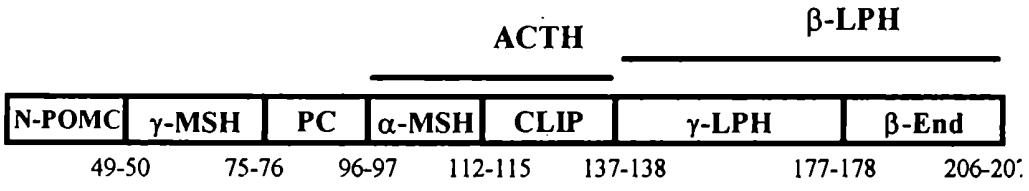


Figura: Estructura de la prohormona de POMC de ratón. El diagrama muestra los sitios de clivaje (pares de residuos básicos) donde ocurre el procesamiento de la prohormona para dar los productos peptídicos. Se indican los números de los aminoácidos que contribuyen a los sitios de clivaje. PC: péptido conector. N-POMC: fragmento aminoterminal. CLIP: corticotropin-like intermediate lobe peptide.

1.1. Procesamiento

Como la mayoría de las proteínas secretadas, la prohormona POMC tiene un péptido señal hidrofóbico N-terminal de 26 aminoácidos y es transportada por la membrana del retículo endoplásmico rugoso (RER) hasta la cisterna donde se corta el péptido señal antes de ser transportada al aparato de Golgi para ser empaquetada en gránulos secretores. La prohormona es cortada por endoproteasas célula-específicas dentro de estos compartimentos ácidos y sus productos son acumulados hasta su liberación (dependiente de calcio) en respuesta a diferentes estímulos según el tipo celular (Tooze *et al.*, 1987).

El precursor es sintetizado principalmente en las células corticotróficas y melanotróficas del lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis, respectivamente, y en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo y del núcleo del tracto solitario en el tallo encefálico (Eipper y Mains, 1980). Contiene 8 pares de aminoácidos básicos y una secuencia de 4 aminoácidos básicos que son los sitios de clivaje de las convertasas recientemente identificadas PC1 y PC2, que tienen diferentes especificidades (Thomas *et al.*, 1991).

En neuronas el procesamiento posttranscripcional da lugar a la producción de ß-endorfina y α-MSH mientras que los corticotropos hipofisarios, que poseen únicamente la convertasa PC1, producen fundamentalmente ACTH (Civelli *et al.*, 1982). El perfil de procesamiento de los melanotrofos es similar al existente en neuronas ya que ambas convertasas están presentes en este tipo celular, pero los péptidos finales presentan un alto grado de N-acetilación. La β-endorfina N-acetilada es incapaz de reconocer al receptor opioide μ y aún se desconce la función no opioide de este péptido (Martin *et al.*, 1979).

1.2. Secreción

La secreción de estos péptidos de POMC es regulada de diferente manera dependiendo del grupo celular. Los corticotrofos hipofisarios están sujetos a regulación humoral, principalmente son estimulados por los factores hipotalámicos arginina -vasopresina (AVP) y hormona liberadora de corticotrofina (CRH), e inhibidos por glucocorticoides (Jones y Gillham, 1988). A diferencia de los corticotrofos, los melanotrofos del lóbulo intermedio presentan una escasa vascularización, pero están inervados por vías dopaminérgicas, GABA-érgicas y serotoninérgicas tuberoinfundibulares. La secreción en estos melanotrofos es controlada principalmente por la liberación tónica inhibitoria dopaminérgica (Lindley *et al.*, 1990) a través de la activación del receptor dopaminérgico D2 en los melanotrofos (Munerama *et al.*, 1980). Las catecolaminas circulantes también podrían participar en esta regulación actuando igual que la dopamina. El ácido γ-aminobutírico GABA ejerce también un efecto inhibitorio sobre la liberación de los melanotrofos (Saland *et al.*, 1992).

Muchos tipos de estrés estimulan la liberación de ACTH, β-endorfina y α-MSH desde las células hipofisarias de POMC. De todos modos, estresores diferentes pueden afectar la liberación de los péptidos derivados de POMC de diferente manera. Por ejemplo fue sugerido que estresores con un impacto emocional alto (inmobilización) causan principalmente liberación de β-endorfina del lóbulo intermedio, mientras que otros tipos de estrés (formalina) producen principalmente una liberación de β-endorfina del lóbulo anterior (Berkembosch, 1984; Kjaer *et al.*, 1995).

En la hipófisis los niveles de liberación de estos péptidos generalmente están acoplados a los niveles de biosíntesis del precursor.

En el cerebro, la regulación de la liberación de los péptidos de POMC está bastante menos caracterizada que en la hipófisis y los resultados son bastante controvertidos. La liberación en el hipotálamo estimulada por CRH (Kapcala y Weng, 1992) y AVP (Sweep y Wiegant, 1982) y es inhibida por esteriodes sexuales (Wardlaw, 1986; Treiser y Wardlaw, 1992) y péptidos opioides endógenos (Bronstein *et al.*,1993). Los efectos de la dopamina sobre esta liberación son contradictorios, estudios *in vitro* e *in vivo* mostraron tanto efectos estimulatorios (Rasmussen et al,1987; Matera y Wardlaw, 1993) como inhibitorios (Vermes *et al.*,1985; Nohtomi, 1984).

Diversos tipos de estrés producen liberación de β-endorfina de neuronas del hipotálamo medio basal, aunque no necesariamente esta liberación está acompañada de una mayor actividad transcripcional (Millan *et al.*,1981; Przewlocka *et al.*,1990; Baubet *et al.*,1994).

1.3. Péptidos derivados de POMC

ACTH, α, β, y γ -MSH y las formas opioides y no opioides de β-endorfina secretadas por estos grupos celulares tienen funciones pleiotrópicas en el control del comportamiento, metabolismo, reproducción y homeostasis del sodio (Watson *et al.*, 1978).

Recientemente han sido identificadas dos subfamilias de receptores acoplados a proteínas G que median las acciones de los péptidos opioides (Chen *et al.*,1993) y de las melanocortinas (Mountjoy *et al.*,1992; Roselli-Rehfuss et al 1993; Gantz et al,1994). Los dos primeros receptores clonados fueron el receptor de α-MSH (MC1-R) (Mountjoy *et*

al.,1992) y el de ACTH (MC2-R) (Chajlani y Wikberg, 1992). Tres receptores adicionales para melanocortinas fueron clonados posteriormente y sus funciones están siendo identificadas a través de la creación de ratones mutantes. Dos de estos receptores de melanocortinas (MC3-R y MC4-R) son expresados principalmente en cerebro (Roselli-Rehfuss et al 1993; Gantz et al,1993)mientras que el receptor MC5-R es expresado principalmente en numerosos órganos periféricos (Griffon *et al.*,1994).

1.3.1. ACTH

La pprimera evidencia experimental que mostró que la secreción hipofisaria de ACTH está regulada por factores hipotalámicos recibió sustento experimental en el año 1955 con experimentos de cultivo de tejidos (Gullemin y Rosemberg, 1955). Recién 26 años más tarde fue identificado y caracterizado el péptido hipotalámico estimulatorio de esta liberación hipofisaria, llamado hormona liberadora de corticotrofina (CRH ; Vale *et al.*,1981). CRH es un péptido de 41 aminoácidos, amidado en su extremo C-terminal, que es sintetizado también como parte de una prohormona; y puede actuar sinérgicamente con arginina vasopresina (AVP) y probablemente otros factores para regular la secreción de ACTH hipofisaria y así regular la actividad del eje hipofisario-adrenal (Rivier y Vale, 1984). Los roles principales de este neuropéptido son la coordinación de los componentes de la respuesta al estrés y la regulación de las reacciones inmune e inflamatoria (Owens y Nemeroff, 1991). A su vez, CRH fue implicada en la patofisiología de un gran número de enfermedades asociadas con autoinmunidad (Chrousos y Gold, 1992) y en trastornos mentales como depresión severa, ansiedad y anorexia (Holsboer *et al.*,1992).

En la hipófisis, CRH actúa uniéndose a receptores de membrana (CRHR), presentes en los corticotrofos del lóbulo anterior. Además de estimular la secreción de ACTH, CRH también estimula la biosíntesis *de novo* de POMC, demostrado en cultivos primarios de células del lóbulo anterior de la hipófisis de ratas (Smith y Funder, 1988) y en la línea celular de origen corticotrófico AtT20 (Reisine *et al.*, 1985).

Otros inductores de la secreción de ACTH son: AVP, oxitocina y adrenalina (Plotsky 1985). Excepto la adrenalina, que es liberada por el núcleo catecolaminérgico del tronco cerebral, el resto de los factores de liberación nombrados son sintetizados y liberados por neuronas de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo. Estudios inmunohistoquímicos demostraron que las neuronas productoras de CRH se encuentran principalmente localizadas en la subdivisión parvocelular del PVN (Swanson *et al.*, 1983), mientras que las que la mayor densidad de neuronas conteniendo AVP se encuentra en la subdivisión magnocelular del PVN (Sawchenko y Swanson, 1982). En condiciones basales los niveles de AVP expresados en neuronas parvocelularesson muy bajos. Sin embargo la remoción de esteroides por adrenalectomía bilateral induce la expresión de altos nivels de AVP en esa zona (Wolfson *et al.*, 1985) lo que sugiere una plasticidad transcipcional considerable este tipo neuronal en roedores adultos.

La acción principal de la ACTH es la estimulación de la secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal (principalmente cortisol en humanos y corticosterona en ratones y ratas) y la estimulación de la expresión de genes codificando enzimas esteroidogénicas (Waterman, 1994). También se han observado efectos extraadrenales de la ACTH, como la participación en el metabolismo de lípidos, glucosa e insulina. A nivel central parece

intervenir en procesos de aprendizaje y memoria (Birnberger 1977) y su acción podría estar involucrando receptores diferentes del MC2-R.

Ha sido sugerido también un rol de ACTH en la modulación de la analgesia inducida por morfina (Smock y Fields, 1981).

1.3.2. α-MSH

La hormona estimulante de los melanocitos, α-MSH, es un tridecapéptido básico cuya secuencia aminoacídica es idéntica a la secuencia N-terminal de ACTH, producto del procesamiento postraduccional de la prohormona POMC. A pesar de esto la α-MSH casi no influencia la liberación de glucocorticoides por la glándula adrenal. La acetilación de este péptido es un proceso importante para la regulación de su actividad biológica. La actividad acetil transferasa presente en los gránulos secretorios es regulada por los mismos estímulos fisiológicos que su liberación (Millington, 1986).

Este péptido recibió su nombre por sus efectos en la pigmentación de la piel de anfibios, aunque su distribución en otros tejidos en mamiferos pronto sugirió que debía tener otras funciones adicionales.

La función primordial de α-MSH en la periferia es la regulación de la síntesis de pigmentos, particularmente en roedores del pigmento negro-marrón eumelanina, por los melanocitos de la piel. Estudios realizados en células provenientes de melanomas mostraron que actúa a través de un mecanismo dependiente de AMP cíclico, activando la expresión de la enzima tirosinasa, quien convierte la tirosina en dopaquinona (Burchill *et al.*, 1986). La dopaquinona da origen a los pigmentos eumelanina o feomelanina (rojo-

amarillo), de acuerdo a las oxidaciones que se produzcan. Mayores niveles de tirosina determinan la síntesis de eumelanina en vez de feomelanina (Burchill *et al.*, 1986).

Se han hallado sitios de unión de alta afinidad para α-MSH en varios tipos celulares no melanocíticos (Tatro y Reichlin, 1987), aunque solamente fue observado el mensajero del receptor MSH-R (MC1-R) en melanocitos (Cone *et al.*, 1993). En roedores se identificaron sitios de unión en un gran número de glándulas exócrinas y endócrinas, en tejido adiposo blanso y pardo, duodeno, piel e hipotálamo.

Los sitios de unión en el cerebro, luego identificados como MC3-R, estarían mediando las acciones antipiréticas ,antiinflamatorias y comportamentales de α-MSH (Catania y Lipton, 1993).

Los receptores a α-MSH recientemente identificados como MC5-R (Chen *et al.*, 1997) de las glándulas exócrinas como la harderiana, la lacrimal, prepucial, clitoral y submandibular responden al agregado de este péptido generalmente aumentando la secreción (Thody *et al.*, 1976). Esta regulación mediada por estrés de la función de las glándulas exócrinas podría ser particularmente interesante teniendo en cuenta que la mayoría de estas glándulas producen feromonas que median comportamientos en mamíferos.

Otras funciones caracterizadas de este péptido de POMC hace bastantes años son la la inducción de lipólisis en el tejido adiposo blanco (Raben *et al.*, 1961), regulación de la secreción de hormonas como la prolactina y la hormona de crecimiento (Khorram *et al.*, 1984), estimulación de la actividad concentradora de iodo en la tiroides (Bowers *et al.*, 1964). α-MSH tiene también capacidad inmunosupresora mediada principalmente por sus efectos en los monocitos y macrófagos, suprimiendo la producción de citoquinas

proinflamatorias y moleculas accesorias en células presentadoras de antígenos (Luger *et al.*, 1997), aunque también estimula la producción del factor supresor IL-10 (Bhardwaj *et al.*, 1996).

También es capaz de modular la proliferacion y diferenciación de queratinocitos y de regular la producción de colagenasa (Luger *et al.*, 1997)

Ha sido demostrado recientemente que en células de melanoma la cantidad de receptores puede ser modulada por el agregado de interferón, lo que explicaría la pigmentación postinflamatoria de la piel (Kameyama *et al.*, 1989).

Se observó también que, luego de una lesión en los nervios periféricos, este neuropéptido estimula el crecimiento neural, y se postuló que cumple un papel fisiológico importante en la regeneración de nervios periféricos, aunque el mecanismo de acción es desconocido (Bijslma, 1983; Strand *et al.*, 1993). La hipótesis que establece que la re-expresión de POMC es parte del repertorio endógeno de respuestas de los nervios periféricos al daño fue confirmada y rechazada por varios investigadores. Platinga et al (1992), utilizando lesiones en el nervio ciático no vieron incrementada la expresión de POMC, sin embargo varios autores observaron una expresión aumentada de este gen luego de cambios en motoneuronas lesionadas o intoxicadas (Gustein *et al.*, 1992; Hughes y Smith, 1993; Smith *et al.*, 1994).

1.3.3. γ-LPH y γ-MSH

La propiedad principal de γ-LPH es la de inducir lipólisis pero también se han descripto efectos cardiovasculares presores (Gruber y callahan, 1989) y elevados niveles de este péptido se han observado en ratas en situaciones de estrés psicológico.

γ-MSH, llamado así por su homología con α-MSH, parece sin embargo no estimular los melanocitos (Ling *et al.*, 1979). El único receptor identificado que une γ-MSH está presente en el cerebro (MC3-R, Roselli-rehfus *et al.*, 1993), pero no se sabe si media sus efectos hipertensores y natriuréticos (Klein *et al.*, 1985) ni su participación en la regeneración nerviosa (Bijlsma *et al.*, 1983).

1.3.4. β-endorfina

La principal fuente de β-endorfina perférica circulante es la hipófisis. Aunque casi toda la β-endorfina producida en el lóbulo intermedio está acetilada en la tirosina aminoterminal y por eso inactiva para los receptores μ, una importante cantidad de β-endorfina activa es liberada por el lóbulo anterior y cosecretada con ACTH en respuesta a la activación del HPA por estrés. No se conocen las funciones de la β-endorfina periférica, aunque se le han atribuido propiedades analgésicas en procesos inflamatorios (Stein *et al.*, 1990).

A nivel central, la β-endorfina es producida por neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo y por neuronas del núcleo del tracto solitario. Las proyecciones desde el núcleo arcuato inervan un número diverso de regiones del cerebro, incluyendo varios núcleos hipotalámicos, el núcleo periventricular del tálamo, estructuras límbicas como la amigdala y el septum (Joseph, 1980). Aunque las proyecciones de las neuronas de POMC del núcleo del tracto solitario no han sido bien documentadas, es posible que compartan regiones terminales con las neuronas hipotalámicas.

Mientras que β-endorfina 1-31 es la forma principal de este neuropéptido, puede experimentar modificaciones adicionales por clivaje carboxiterminal (Dores *et al.*, 1986). Alteraciones en las cantidades relativas de estas formas procesadas diferencialmente de β-endorfina pueden ser fisiológicamente importantes, ya que las modificaciones posttraduccionales de la β-endorfina 1-31 alteran las características opioides del péptido.

β-endorfina participa en una serie de respuestas fisiológicas adaptativas mediadas por estrés. Entre estas funciones las más estudiadas en mamíferos son la elevación del umbral del dolor (analgesia), el mantenimiento de la homeostasia a través del control de la temperatura corporal y de la presión arterial, la modulación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal la regulación del sistema nneuroinmune, la inhibición de la reproducción y el deterioro de la consolidación de la memoria (Olson *et al.*, 1997).

Existe una nutrida cantidad de evidencias experimentales que indican la participación de péptidos opioides endógenos como inhibidores fisiológicos de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, tanto en roedores como en primates (Bruni *et al.*, 1977; Bhanot y Wilkinson, 193). Desde hace varios años se postula que los esteroides sexuales ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre las hormonas gonadotróficas a través de los opioides endógenos. Las neuronas hipotalámicas productoras del factor liberador de gonadotrofinas (GnRH) son incapaces de captar estradiol o testosterona (Shivers *et al.*, 1983), pero en cambio sí lo hacen neuronas opioidérgicas vecinas (Morrel *et al.*, 1981). El receptor opiopide μ parece paticipar en estas sinapsis (Panerai *et al.*, 1985) y evidencias inmunohistoquímicas sugieren que estas neuronas son endorfinérgicas (Thindt y Goldsmith, 1988).

La participación de péptidos opioides endógenos en la consolidación de la memoria,en particular la β-endorfina, está sustentada por una numerosa serie de evidencias experimentales (Flood *et al.*,1987; Izquierdo y Dias, 1985; Netto *et al.*,1985). En general los antagonistas opioides facilitan la retención de una tarea aprendida, mientras que los agnistas inducen amnesia.

Los péptidos opioides endógenos, junto con neurotransmisores no opiopides, también media la respuesta analgésica mediada por estrés (Watkins, 1986). La existencia de un sistema inhibidor del dolor intrínseco fue demostrado, inicialmente, por la inducción de analgesia por estimulación eléctrica de núcleos cerebrales (Mayer *et al.*,1951). Los efectos analgésicos de la estimulación eléctrica fueron reproducidos por la microinyección de opioides en las mismas regiones del cerebro (Yakhs y Rudy, 1978). Más tarde numerosas evidencias farmacológicas y neuroanatómicas implicaron a la β-endorfina, las encefalinas y dinorfinas en el control del dolor (Akil *et al.*,1986; Pasternak, 1993).

1.3.4.1. Efectos de la β-endorfina sobre la liberación de oxitocina.

La oxitocina (OT) es un nonapéptido producido principalmente en los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo. Originalmente fue caracterizada como una hormona de la neurohipófisis, pero ahora está claro que las fibras oxitocinérgicas proyectan hacia varias regiones del cerebro y que la oxitocina funciona como un neurotransmisor. Los efectos centrales están mediados por un receptor acoplado a proteína G (Kimura *et al.*,1992).

Este péptido ha sido involucrado en varios aspectos de la reproducción, incluyendo el comportamiento sexual (Witt y Insel, 1991), inducción del parto (Fuchs *et al.*, 1982), liberación de leche (Smith, 1989) y comportamiento materno (Pedersen *et al.*, 1994). Sin embargo ratones deficientes para la producción de oxitocina no mostraron alteraciones en ninguno de esos comportamientos, únicamente fueron incapaces de amamantar a sus crías pese a producir leche normalmente (Nishimori, 1996).

Los péptidos opioides endógenos participan en la regulación fisiológica de oxitocina (OT) del sistema hipotálamo-neurohipofisario. En condiciones de deshidratación, hemorragia o estimulación osmótica, los péptidos opioides endógenos modulan la liberación de oxitocina permitiendo la secreción preferencial de vasopresina (Summy-Long etal, 1984). También estos péptidos opioides disminuyen la liberación de OT durante el parto, cuando la hormona actúa en la expulsión del feto (Hartman *et al.*, 1986). El rol de los péptidos opioides endógenos en la regulación de la liberación de OT en respuesta a la succión durante la lactancia es poco claro. La administración de morfina a ratas y ratones lactantes disminuye la ganacia de peso de las crías durante el amamantamiento (Haldar etal, 1988; Russell *et al.*, 1984), indicando una inhibición de la liberación de OT. Agonistas opioides también bloquearon el reflejo de liberación de leche en ratas anestesiadas (Clarke y Wright, 1984). De todos modos el uso de antagonistas opioides para evaluar el papel de los péptidos opioides endógenos en la secreción de OT inducida por succión, mostró resultados contradictorios. La administración de naloxona a ratas anestesiadas aumenta la OT liberada durante el reflejo de liberación de leche (Clarke *et al.*, 1979). Sin embargo en ratas conscientes los antagonistas opioides parecen no tener efecto sobre la liberación de OT durante la

succión (Haldar y Bade, 1981; Hartman *et al.*, 1985), salvo que éstas esten deshidratadas (Hartman *et al.*, 1987).

Evidencias electrofisiológicas indican que existen proyecciones desde el núcleo arcuato hacia el supraóptico (Leng *et al.*, 1988). Esta observación es interesante porque sugiere que la relación entre los sistemas endoerfinérgico y oxitocinérgicopodría ser directa.

Además, los niveles del menasajero de POMC y del péptido β-endorfina están modificados en el núcleo arcuato durante la preñez, mientras que los niveles de los opioides proenkefalina y prodinorfina en las neuronas magnocelulares no están alterados (Douglas *et al.*, 1995).

La administración intracerebroventricular de CRH resulta en una disminución dosis-dependiente en la cantidad de leche ingerida por las crías, indicando un posible efecto inhibitorio sobre la secreción de OT inducida por succión (Almeida *et al.*, 1994). Este efecto podría estar mediado por la β-endorfina.

En humanos, el estrés psicológico reduce la liberación pulsatil de OT inducida por succión , sugiriendo una modulación central en el reflejo de liberación de leche (Ueda *et al.*, 1994). Aunque la administración de naloxona no modificó la liberación de oxitocina inducida por succión en mujeres en condiciones normales, revirtió la inhibición de esta liberación ejercida por la adminisrtación de etanol (Coiro *et al.*, 1992). Como uno de los efectos del etanol podría ser la inducción de la liberacción de β-endorfina, podría ser esta última la responsable de la inhibición de la liberación de OT, efecto antagonizado por la administración de naloxona.

Otra evidencia que relaciona a la β-endorfina con la inhibición de la liberación de OT viene de mediciones realizadas en animales de granja. En vacas y cabras la cantidad de

leche extraíble (y la cantidad de OT liberada) es menor si el ordeñe se realiza en lugares no familiares, y va regresando gradualmente a los valores originales a medida que el ambiente se va volviendo familiar, por repetidas visitas. Esta adaptación está inversamente relacionada con las concentraciones de β-endorfina en sangre (Bruckmaier *et al.*, 1996).

1.3.4.2. Relación entre la β-endorfina y el consumo de alcohol.

La amplia difusión del etanol como droga de abuso ha determinado que el alcoholismo sea uno de los problemas más graves existentes en salud pública.

El alcohol ejerce numeroso efectos farmacológicos a través de su interacción con varios neurotrnsmisores y neuromoduladores. Entre estos, los opioides endógenos tienen un papel importante en las propiedades adictivas (rewarding) del etanol. Las propiedades de refuerzo y recompensa de los ligandos de los receptores opiodes μ y δ (enkefalinas) son mediadas por la activación del sistema mesolímbico dopaminérgico que asciende desde el área ventral tegmental (VTA) hasta estructuras rostrales entre las cuales se encuentra el núcleo acumbens (NAC), de particular importancia en los procesos de adicción. La manifestación neuroquímica de este efecto es un aumento en la liberación dopaminérgica en el NAC.

Varias líneas de evidencia indican que el alcohol interfiere con mecanismos opioides endógenos que están relacionados con la transmisión dopaminérgica en la vía mesolímbica.

Hay mucha información sobre los efectos directos de el alcohol (agudos y crónicos) en las propiedades de unión de los receptores opioides y de la modulación de la síntesis y

secreción de péptidos opioides , más particularmente un aumento en la liberación de β-endorfina.

Los estudios de auto-administación de etanol realizados en roedores y primates mostraron que bajas dosis de morfina aumentan el consumo de alcohol, mientras que altas dosis del opioide lo disminuyen.

Del mismo modo, antagonistas opioides como la naloxona y la naltrexona disminuyeron el consumo de alcohol en varias condiciones experimentales. Similares resultados fueron obtenidos inyectando antagonistas selectivos para los receptores μ o δ.

Resultados obtenidos en modelos genéticos de preferencia por etanol también apoyan la idea que el consumo de alcohol depende de la actividad de recompensa desarrollada por el sistema opioide endógeno y que la ingesta de etanol podría compensar deficiencias inherentes a este sistema. Un modelo hipotético propone que la recompensa proviene de la activación de receptores opioides μ en el VTA y/o receptores δ en el NAC, dos núcleos blanco de la acción de β-endorfina. Ha sido sugerido que el etanol interfiere con esta vía de recompensa directa o indirectamente.

En estudios realizados en humanos se observó que personas con alto riesgo de convertirse en alcoholicos (historia familiar de alcoholicos), tenían menores niveles plasmáticos de β-endorfina y una mayor liberación de este péptido opiopide en respuesta al etanol, que individuos con bajo riesgo de alcoholismo. En estudios utilizando animales se vió que la actividad basal y la liberación de de β-endorfina en respuesta al alcohol era mayor en hipotálamos de ratones seleccionados por su preferencia al etanol que en ratones control. La pronunciada liberación de β-endorfina en respuesta al etanol en animales que

muestran preferencia por alcohol está asociada con mayor densidad de receptores.. En regiones involucradas con procesos de refuerzo (NAC, VTA), los receptores δ están aumentados en ratones y los μ en ratas con preferencia por alcohol (Gianoulakis, 1996).

Los datos experimentales están de acuerdo con aquellos obtenidos en estudios clínicos que indican que antagonistas opioides redujeron la frecuencia y la severidad de recaídas en alcohólicos.

Varias líneas de evidencia indican también que el etanol funcionaría como un sustituto neuroquímico de reforzadores convencionales como el alimento y el sexo. De echo los sistemas dopaminérgicos y opioides activados por el etanol también son activados por estos reforzadores convencionales.

En realidad, la activación de los sitemas dopaminérgico mesolímbico y opioide serían los responsables de las propiedades de recompensa, eufóricas, moto-estimuladoras y de los procesos de creación de hábitos de autoadministración y de adquisición de reforzadores secundarios relacionados con el etanol (aprendizaje incentivo). Los efectos sedantes y las propiedades trofotrópicas (pérdida de control) del etanol parecen estar mediados por el sistema GABAérgico endógeno (Di Chiara *et al.*, 1996).

2. Gen de POMC

En la mayoría de las especies estudiadas existe un único gen de POMC, aunque en el ratón se encontró un pseudogen adicional que no produce un mensajero funcional

(Lundblad y Roberts, 1988). Este gen contiene 3 exones separados por dos intrones y su estructura es similar en todas las especies de mamíferos. Se expresa principalmente en la hipófisis en los corticotrofos y melanotrofos del lóbulo anterior e intermedio, respectivamente y en el cerebro en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo (Watson *et al.*, 1978) y en neuronas del núcleo del tracto solitario (Shwartzberg y Nakane, 1983) y constituye un ejemplo paradigmático de la expresión génica regulada de manera célula-específica. Se ha reportado también la presencia de ARN mensajero de POMC en regiones del cerebro como la amígdala y la corteza (Civelli *et al.*, 1982), en testículos y ovarios (Pintar *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1986) y en macrófagos del bazo (Lolait *et al.*, 1986).

La longitud del transcripto maduro desde el sitio de *capping* hasta el sitio de corte en la región 3'es de aproximadamente 1100 bases en la hipófisis y en macrófagos, mientras que en el hipotálamo se observa una mayor extensión de la cola de poli A (Jeannotte *et al.*, 1987). En los tejidos periféricos se detectaron transcriptos más cortos (~700-900 bases) originados por la iniciación de la transcripción a partir de sitios ubicados en las cercanías del extremo 5' del exón 3 (Lacaze-Masmonteil *et al.*, 1987). De todos modos la importancia funcional de estos transcriptos no está clara teniendo en cuenta la ausencia de un marco de lectura abierto.

2.1. Regulación trasncripcional del gen de POMC

La expresión célula-específica de genes depende de la interacción entre secuencias de ADN presentes en las cercanías de la unidad transcripcional y factores de transcripción nucleares existentes en un subtipo particular de células. La región ubicada hacia el

extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción es el promotor, que resulta esencial para ensamblar al complejo mayor de transcripción formado por la ARN polimerasa II e iniciar la transcripción. Los promotores de una amplia variedad de genes comparten secuencias consenso como la TATAA box, la CAAT box y la CG box que reconocen factores de transcripción ubicuos. Sin embargo, esta región sola es ineficiente para promover la expresión de genes en células transfectadas y en ratones transgénicos. Secuencias nucleotídicas capaces de interactuar con factores nucleares presentes sólo en una subpoblación restringida de células son los responsables de asegurar un patrón de expresión espacial y temporal único para cada gen. Otras secuencias de ADN participan en la regulación de los niveles de expresión de acuerdo a particulares estadios fisiológicos celulares determinando aumentos (*enhancers*) o disminuciones (silenciadores) en la actividad transcripcional. Para entender las bases moleculares de estas interacciones es necesario identificar las secuencias nucleotídicas que, actuando en cis, son reconocidas por proteínas transactivadoras. Así, las regiones flanqueantes que controlan la transcripción de un gen pueden ser testeadas en sistemas de expresión adecuados en donde la transcripción se inicie específicamente a partir del reconocimiento de secuencias regulatorias por factores presentes en un determinado tipo celular y proporcionar una herramienta muy útil para el aislamiento de factores de transcripción. El sistema de expresión más apropiado para el estudio de regiones de ADN regulatorias es el de ratones transgénicos. Este modelo permite analizar las regiones de ADN deseadas *in vivo*, en el contexto del animal entero, contrariamente a lo que ocurre cuando se emplean líneas celulares. Una vez identificadas las regiones de ADN capaces de dirigir correctamente la expresión del gen estudiado se utilizan varias metodologías experimentales complementarias que operan en base a la unión específica entre ADN y

proteínas, como son los ensayos de retardamiento en geles, *in vivo* e *in vitro footprinting*, identificación de sitios hipersensibles a la ADNsa I y el clonado de genes por expresión, que permiten la caracterización de los motivos de ADN y factores de transcripción involucrados en dicha regulación.

Si bien estos elementos regulatorios que participan en *cis* (necesarios para que la expresión de un transgén resulte espacial y cuantitativamente similar a la del gen endógeno) se encuentran en la vecindad de la región codificante de los genes, pueden existir regiones de control de un locus (LCR) ubicados a grandes distancias de las secuencias codificantes que resultan esenciales para la correcta expresión de ciertos genes, como por ejemplo los genes de ß–globina humano y de lisozima de pollo (Grosveld *et al.*, 1987; Blom Van Assendfelt, 1989). Recientemente se han identificado regiones de asociación a la matriz nuclear (MARs) en los límites de zonas transcripcionalmente activas para varios genes y se localizan también a grandes distancias de la unidad transcripcional. La presencia de LCRs y MARs específicos a ambos extremos de un transgén garantizaría una entidad transcripcional activa independientemente del sitio de integración cromosomal del transgén.

El gen de POMC es uno de los precursores de neuropéptidos que comienza a expresarse en estadios más tempranos del desarrollo del sistema nervioso central (Japon *et al* .,1994) y cada uno de los tipos celulares que lo expresan tiene un programa ontogénico particular para su expresión. Los péptidos derivados de POMC son también los primeros productos hormonales maduros producidos por la glándula hipófisis durante el desarrollo (Elkabes *et al.*,1989). Esto sugiere la participación de péptidos derivados de POMC en la regulación del crecimiento y la diferenciación de los sistemas nervioso y endócrino.

Otras diferencias en la transcripción del gen de POMC en los distintos tipos celulares se encuentran en el complicado conjunto de señales hormonales, que incluye neurotransmisores centrales, neuropéptidos, y hormonas esteroides (Lundblad y Roberts, 1988: Autelitano *et al.*, 1989).

Experimentos de distintos grupos han demostrado que secuencias 5' flanqueantes del gen de POMC (-706 a +64) son suficientes para inducir niveles moderados de expresión en células transfectadas de fenotipo corticotrópico AtT20 (Jeanotte L*et al.*, 1987). Estas secuencias también dirigen la expresión de genes reporteros específicamente a hipófisis de ratones transgénicos (Tremblay *et al.*, 1988, Rubinstein *et al.*, 1993).

La comparación de estudios delecionales y mutacionales del promotor de POMC en células AtT20 transfectadas y en ratones transgénicos revela similitudes y diferencias. La región 5' flanqueante contenida entre los nucleótidos -408 y -34 se ha caracterizado en su tercio distal, central y proximal. Deleciones sucesivas de esas regiones resultan en una pérdida gradual de la actividad promotora en células AtT20, aunque aún la región comprendida por los nucleótidos -43 al +64 mantiene algún nivel de actividad. Drouin *et al* (1991) sugirieron que combinaciones de elementos en los dominios distal y central son importantes para la expresión específica de POMC en la hipófisis. Sin embargo, datos obtenidos en ratones transgénicos son consistentes con un importante rol de los dominios proximal y central para la determinación de la expresión específica en hipófisis (Liu *et al.*, 1992). Entre las diferencias encontradas en estudios *in vitro* e *in vivo* se incluye la observación de Riegel *et al* (1990), quienes sugieren que un sitio ubicado en la posición -15 a -3 del gen de POMC contribuye a la actividad basal del gen en células AtT20.

Estudios en ratones transgénicos mostraron, sin embargo, que el reemplazo de esta región por el promotor viral de la timidina kinasa no modifica la expresión célula-especifica de POMC en la hipófisis (Liu *et al.*, 1992). Aunque los estudios en ratones transgénicos usando múltiples versiones de transgenes con variadas deleciones o mutaciones del promotor y diferentes reporteros jamás han disociado la expresión en los corticotrofos y en los melanotrofos, los transgenes mostraron una tendencia definida a una mayor expresión en el lóbulo intermedio comparada con la del lóbulo anterior. Esta observación, junto con los dos días de diferencia en la activación del gen de POMC durante el desarrollo sugiere que los 2 tipos de células hipofisarias que expresan POMC difieren en los mecanismos íntimos de control transcripcional (Hammer *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992).

2.1.1. Factores de transcripción que interactúan con el gen de POMC

Experimentos de footprinting de DNAsa del promotor de POMC y secuencias 5′ flanqueantes se ha demostrado que múltiples elementos de ADN interactúan con proteínas presentes en extractos nucleares de células AtT20 pero la cantidad e importancia de esos factores son todavía desconocidas.

La caracterización de la unión del receptor de glucocorticoides a una región del gen de POMC ubicada en la posición -60, produciendo la inhibición transcripcional, llevó a la identificación de el elemento de respuesta negativa a glucocorticoides (nGRE)(Charron y Drouin, 1986; Drouin *et al.*, 1989). La unión del receptor de glucocorticoides al nGRE tiene propiedades particulares, ya que la estructura del receptor es homotrimérica y resulta de la unión de un homodímero a un lado del ADN y la posterior unión de otro

monómero al lado opuesto (Drouin *et al.*, 1993). De todos modos el mecanismo preciso de inhibición transcripcional no está ciertamente dilucidado, demostrado por el hecho de que la porción distal de la región 5' flanqueante parece necesaria para la regulación negativa independiente del nGRE (Riegel *et al.*, 1991).

Igual que para la regulación negativa ejercida por los glucocorticoides, parece haber múltiples elementos responsables de la activación por CRH en el promotor de POMC; aunque ninguno de ellos aparenta ser el .

clásico elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE), TGACGTCA, que une la proteína CREB.

Utilizando deleciones secuenciales en la región 5' del promotor de POMC de rata, Roberts et al (1987) localizaron un elemento que confiere inducibilidad a CRH sin alterar la expresión basal, en la región comprendida entre los nucleótidos -263 y -133. Más tarde identificaron un factor presente en extractos de células AtT20 que se unía a este elemento en respuesta a la inducción por CRH (Jin *et al.*, 1994).

Utilizando ensayos de protección a exonucleasas se identificaron sitios de unión a AP-1 y AP-2 en la región comprendida entre los nucleótidos -141 y - 106 del promotor murino, homóloga a la región -169 -134 del gen de rata (Bishop *et al.*, 1990). AP-2 transduce las señales intracelulares dependientes de AMP cíclico mediadas por las proteínas kinasas A (PKA) y C (PKC) en varios genes (Imagawa *et al.*, 1987) y AP-1 transduce directamente las sñales mediadas por PKC (Lee *et al.*, 1987) e indirectamente las mediadas por PKA en células AtT20 (Bouitillier at al, 1992), pero en el caso del gen de POMC ninguno de estor factores parecería estar participando en la transducción de la acción de CRH (Bishop *et al.*, 1993).

También fue descripto un sitio consenso de unión al factor AP-1, TGACTCA, centrado en el nucleótido +43 del exón 1 (Diamond *et al.*, 1990; Riegel *et al.*, 1991), pero igual que el sitio de unión a PO-B localizado entre la TATA box y el sitio de iniciación de la transcripción (Riegel *et al.*, 1990), es dispensable para la expresión regulable por hormonas y célula-específica en ratones transgénicos (Liu *et al.*, 1992).

Más recientemente fueron identificados dos sitios de unión al factor SP1 y un sitio de unión a un factor químicamente no identificado llamado PP1 (putative pituitary POMC1). Estudios en animales transgénicos demostraron que la unión del factor PP1 es requerida para la expresión célula específica de POMC en la hipófisis, mientras que el rol de SP1 parece ser menos importante. PP1 fue encontrado únicamente en celúlas que expresan POMC (Liu *et al.*, 1995).

Una proteína llamada CUTE (corticotroph upstream transcription element-binding) se une a secuencias del tipo caja E, de unión a factores helix-loop-helix, en el promotor de POMC (Therrien y Drouin, 1993). Estudios en animales transgénicos mostraron que el CUTE no es requerido para la expresión correcta de los transgenes (Liu *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995).

El factor de transcripción Brn-3.0, que pertenece a la familia de factores conteniendo dominios POU, es expresado en células AtT20 y se une a una región necesaria para la expresión célula específica de POMC, aunque su significancia funcional no está clara (Gerrero *et al.*, 1993). La observación que un factor POU se une al promotor de POMC es interesante ya que un miembro de esa familia de factores de transcripción, Pit-1, regula la proliferación o la supervivencia (o ambas cosas) de tres tipos celulares de la hipófisis anterior (lactotrofos , tirotrofos y somatotrofos) y funciona como activador transcripcional de los genes de hormona de crecimiento y de prolactina (Li *et al.*, 1990).

Sin embargo el sitio de unión a Brn-3.0 puede ser deletado sin perder la expresión hipofisaria específica en ratones transgénicos (Liu *et al.*, 1995).

Más tarde fue identificado Ptx1 (pituitary homeo box 1), una homeoproteína relacionada con los genes bicoid y orthodenticle de Drosophila, y Otx-1 y Otx-2 en mamiferos. Ptx1 activa la transcripción uniendose a una secuencia del gen de POMC relacionada con los sitios de unión de bicoid en Drosophila (Lamonerie *et al.*, 1996). Como es expresado en todas las células del bolsillo de Rathke (primordio de la hipófisis) y su expresión es muy temprana, los autores proponen que interviene en el desarrollo de la glándula y que posteriormente los corticotrofos lo reclutan para regular la expresión célula específica del gen de POMC. En 1997 Poulin et al demostraron que CUTE era un complejo proteico que contenía NeuroD1 asociado a otros factores ubicuos del tipo HLH y que actuaba sinérgicamente con Ptx1 en la expresión célula específica de POMC.

Interacciones proteína-proteína entre distintas clases de factores de transcripción deben ser esenciales para la unión de alta afinidad de factortes al promotor de POMC y la activación transcripcional completa.

2.2. Antecedentes en la búsqueda de elementos específicos de neuronas del gen de POMC

La identificación de *enhancers* específicos de neuronas del gen de POMC y de los factores que a estos se unan puede tener relevancia para muchos otros genes de neuropéptidos. Se conoce muy poco acerca de los mecanismos que controlan la expresión de los genes de neuropéptidos en el sistema nervioso central en comparación con los de las células de tejidos periféricos. Debido en parte a la falta de líneas celulares neuronales

de fenotipos definidos. Para comprender completamente el rol fisiológico de los neuropéptidos en la función neuronal es necesario caracterizar su regulación génica en el SNC. Un *enhancer* neuronal del gen de POMC podría utilizarse para expresar otras proteínas o transcriptos antisentido de ARN en el núcleo arcuato de ratones transgénicos como un modo de investigar la neurobiología de estas células que estan íntimamente ligadas al control neuronal de la reproducción, integración de las respuestas al stress, termorregulación, control del peso corporal y otros reflejos autonómos. También es posible mediante la oncogénesis dirigida obtener líneas neuronales del núcleo arcuato análogas a las desarrolladas de neuronas catecolaminérgicas (Suri *et al.*,1993) y de GnRH (Mellon *et al.*, 1990).

La manera de identificar regiones del gen de POMC que regulen la expresión célula-específica es la de expresar genes reporteros en ratones transgénicos y luego analizar la expresión en la hipófisis, cerebro y tracto reproductivo. En estudios iniciales se utilizó el gen lac Z de *E. coli* porque posee la doble ventaja de ser medible histoquímicamente a nivel de células individuales y enzimáticamente en extractos de tejidos para estimar la transcripción de forma cuantitativa. Estos experimentos demostraron que las secuencias de POMC localizadas entre los nucleótidos -706 y +64 fueron suficientes para dirigir la expresión de los transgenes a melanotropos y corticotropos de manera específica (Hammer *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 1992). Como resultado de la adrenalectomía bilateral, la actividad de ß-galactosidasa aumentó fuertemente en forma paralela a la expresión del gen de POMC sólo en el lóbulo anterior de la hipófisis mientras que la administración prolongada del antagonista dopaminérgico D2 haloperidol produjo el mismo efecto en los melanotrofos del lóbulo intermedio. La proporción de líneas independientes que expresaron este transgén fue baja (2/7) y un alto porcentaje de corticotrofos pudo ser

visualizado por histoquímica únicamente luego de la adrenalectomía. Se produjo otra serie de ratones con un transgén POMC-lac Z conteniendo 4 kb de la región 5' flanqueante del gen de POMC de rata que también mostró una expresión preferencial en melanotrofos. Las 7 líneas independientes que expresaron el transgén en la hipófisis tuvieron expresión ectópica en varias áreas del SNC pero nunca se observó expresión en el núcleo arcuato (Rubinstein *et al.*, 1993).

Para estudiar más en detalle las secuencias necesarias para una adecuada expresión hipofisaria del gen de POMC, se construyó una serie de transgenes delecionales con los que se obtuvieron varios pedigrés de ratones. El primer grupo de los genes de fusión contenía cantidades variables de secuencias 5' flanqueantes del gen de POMC ligadas a la posición +64, dentro de la región no traducible del primer exón, a lac Z o a un cassette reportero del antígeno T del SV40. Por lo tanto cada uno de estos transgenes contenía la TATA box endógena de POMC. Mientras la ausencia de secuencias entre -4000 a -323 del promotor de POMC no modificó los niveles de expresión en melanotropos y corticotropos hipofisarios determinado por histoquímica de inmunofluorescencia, una deleción mayor, hasta el -166 resultó en una pérdida completa de expresión hipofisaria (Liu *et al.*, 1992).

En todos los casos anteriores, aún los transgénicos con fuerte expresión en la hipófisis no mostraron expresión en el núcleo arcuato del hipotálamo ni en los órganos reproductivos en ninguna de las líneas obtenidas. A partir de estos datos se concluye que los elementos regulatorios del gen de POMC suficientes para una expresión hipofisaria precisa se encuentran localizados entre los nucleótidos -323 y +64. La falta de expresión en neuronas del núcleo arcuato aún de la construcción que contiene las 4 kb, sugiere la existencia de un elemento específico para neuronas en una región diferente del gen de

POMC. Esto fue confirmado con la producción de 6 líneas de ratones transgénicos con un clon genómico de POMC de 10.2 kb, conteniendo la unidad transcripcional completa y 2 kb flanqueantes a ambos lados, marcado por la inserción de un oligonucleótido dentro del tercer exón (HAL*). Estos ratones mostraron una expresión normal del gen de POMC endógeno en el núcleo arcuato y en la hipófisis pero la expresión de HAL* en cada una de las 6 líneas estuvo limitada a la hipófisis, obsevada por hibridización *in situ* de secciones seriadas de cerebro e hipófisis utilizando como sonda un oligonucleótido que reconoce específicamente el oligonucleótido heterólogo insertado en el tercer exón del transgén (Rubinstein *et al.*, 1993).

El nivel de expresión del transgén de 10.2 kb en corticotropos en condiciones basales fue generalmente mucho menor al del gen endógeno, y una semana después de la adrenalectomía las expresiones se correlacionan topológicamente y en cantidades estimadas de ARNm. Estas observaciones sugieren que en estos transgenes faltaría al menos un *enhancer* necesario para obtener niveles basales normales de transcripción de POMC en corticotrofos. Esta disminución en la actividad transcripcional basal puede ser compensada aparentemente por la combinación de señales regulatorias producidas como resultado de la adrenalectomía, incluyendo activación por el factor liberador de corticotrofinas (CRF) y posiblemente la liberación de la inhibición del gen de POMC por glucocorticoides. Es interesante que en los corticotrofos de la hipófisis embrionaria los transgenes también son expresados adecuadamente (M. Rubinstein y M.J. Low, observaciones no publicadas) sugiriendo que la ausencia de la actividad del *enhancer* basal del adulto podría ser substituida por señales presentes durante el desarrollo. No hay otras evidencias experimentales para un elemento represor de expresión basal en el promotor del gen de POMC en corticotrofos. En los ratones transgénicos la expresión del

transgén mostró un paralelismo con la del gen endógeno en respuesta a manipulaciones endócrinas (adrenalectomía y administración de haloperidol). La expresión de los transgenes fue también monitoreada durante el desarrollo en embriones murinos de 10,5 a 17,5 días después de la fertilización. Se detectó primero inmunohistoquímicamente la expresión de POMC y la expresión del transgén de POMC en corticotrofos en los días e13,5 y e14,5 respectivamente. En melanotrofos del lóbulo intermedio se detectó la expresión del gen normal y del transgén en el día e15,5 confirmando que la correcta activación de la expresión espacial y temporal de POMC requiere los mismos elementos regulatorios mínimos que la regulación célula-específica y hormonal. La mayor sensibilidad aportada por las hibridizaciones *in situ* permitió demostrar inequívocamente que la expresión neuronal de POMC en el núcleo arcuato está disociada de la expresión en la hipófisis. Esto fue confirmado adicionalmente en experimentos recientes usando una nueva serie de transgenes con mutaciones específicas en los sitios 1 y 2 del promotor de POMC combinadas con el gen reportero de luciferasa, extremadamente sensible. Estos datos sugieren que la expresión neuronal auténtica de POMC requiere por lo menos un elemento distal adicional que no es necesario para la expresión célula-específica en la hipófisis. Existen distintos ejemplos, que incluyen al gen de glucagon (Lee et al., 1992), apolipoproteína E (Simonet et al., 1991) y la subunidad α de la hormona glicoproteica (Hamernik et al., 1992), en donde *enhancers* tejido-específicos dentro de un mismo gen son responsables de dirigir la expresión a cada tipo celular donde estos genes son expresados.

3. Modificación dirigida de genes por recombinación homóloga en células de mamíferos

Avances en el campo de la biología experimental han permitido la introducción de ADN purificado dentro de células de mamíferos. Estas secuencias de ADN permanecen extracromosomales por un tiempo corto (48-72 hs), luego del cual el ADN se pierde o es integrado dentro del genoma celular. Si el ADN introducido no tiene un homología significativa con el ADN celular, la integración se realiza al azar (transgénicos clásicos).

Cuando el ADN introducido tiene homología con las secuencias celulares, puede tener dos destinos. Frecuentemente es integrado al azar, esta integración es independiente de la homclogía de secuencias (recombinación no homóloga), pero ocasionalmente el ADN introducido es integrado por un evento de recombinación basado en la homología (recombinación homóloga).

La transferencia génica por integración al azar ha demostrado ser muy útil para la identificación de elementos de acción en cis importantes para la expresión específica de tejidos y de estadios del desarrollo; pero la inprevisibilidad del sitio de integración ha sido un obstáculo para muchos experimentos.

La posibilidad de direccionar genes a posiciones definidas en el genoma de mamíferos posibilita la inactivación, mutación o corrección de genes específicos.

Inicialmente, la modificación del genoma de mamíferos por recombinación homóloga se realizaba en líneas celulares, pero la disponibilidad de células proliferativas indiferenciadas de embriones de ratón a partir de las cuales es posible generar un ratón aumentó muchísimo la utilidad de la recombinación homóloga. Evans y Kaufman (1981) demostraron que células de la masa interna de blastocistos de ratón pueden ser adaptadas

para crecer en cultivo y luego estimuladas a continuar con su programa de desarrollo al ser reintroducidas en el blastocele de blastocitos que luego son implantados en el útero de hembras pseudopreñadas. El echo de que estas células se dividan en cultivo hizo posible u modificación por recombinación homóloga y su uso para generar ratones quiméricos. Si la línea germinal de estas quimeras es colonizada por las células modificadas, entonces la modificación introducida in vitro puede ser transmitida genéticamente a las generaciones sucesivas (Capecci, 1989).

3.1. Introducción de una mutación dirigida en el gen de POMC

La aplicación más ampliamente utilzada de la recombinación homóloga es la de identificación de funciones génicas y la de creación de modelos de enfermedades genéticias humanas. La estrategia general es la de inactivar de una copia del gen de interés, deletando regiones codificantes esenciales de la proteína (Knock out de genes). Estos alelos nulos son útiles para muchos propósitos, pero también pueden resultar en fenotipos letales, lo que impide un estudio completo de su función.

En particular para el gen de POMC ,el análisis de un fenotipo resultante de un alelo nulo sería muy complicado por la diversidad de péptidos generados por el precursor único.

Para estudiar con detalle funciones fisiológicas del péptido β-endorfina Rubinstein et al (1993b), diseñaron un nuevo tipo de vector de reemplazo que incluía marcadores de selección y introducía una mutación puntual en una porción traducida del gen de POMC que resultó en la ausencia selectiva de la producción de este neuropéptido. El codón para la tirosina amino-terminal de la β-endorfina fue cambiado por un codon stop prematuro por mutagénesis dirigida en el vector de reemplazo y el cassette de selección neomicina

fue posicionado en el brazo corto del vector en una región 3' flanqueante del gen de POMC que no intervendría en la regulación de la expresión.

4. Antecedentes en el estudio del fenotipo de ratones mutantes para la producción de β-endorfina

Los ratones mutantes no mostraron alteraciones observables durante el desarrollo, ni comportamentales , ni en el funcionamiento del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Los primeros estudios estuvieron dirigidos a investigar la participación de β-endorfina en la respuesta analgésica mediada por estrés. Entre los resultados más destacados se encuentra la observación que los ratones deficientes en β-endorfina mostraron una respuesta analgésica normal luego de recibir morfina, indicando la presencia de receptores μ funcionales. Sin embargo la respeusta analgésica mediada por estrés, inducida por la liberación de péptidos opioides endógenos, sólo fue observada en los ratones control mientras que desapareció en los ratones mutantes demostrando que la β-endorfina desarrolla un papel clave en este tipo de respuesta opioide (Rubinstein *et al.*, 1995).

OBJETIVOS

1. Estudiar las secuencias regulatorias del gen de POMC capaces de dirigir la expresión célula-específica en neuronas utilizando ratones transgénicos como modelo de estudio.
2. Caracterizar funciones neuroendócrinas de β-endorfina utilizando ratones transgénicos incapaces de sintetizar este péptido.

MATERIALES Y METODOS

Construcción de transgenes

Producción de una biblioteca genómica de ratón

Una biblioteca cósmidica de ratón fue construida digiriendo parcialmente AND genómico obtenido de células embrionarias indiferenciadas de ratón 129/SvEv, utilizando la enzima *MboI*. Los fragmentos fraccionados por tamaño fueron ligados al sitio *BamHI* del vector cosmídico S-Cos 1 y luego empaquetados in vitro utilizando extractos de empaquetamiento Gigapack II. Los cósmidos recombinantes fueron luego transfectados en bacterias *E. coli* NM554. El título final de esta biblioteca fue de 3.10^5 clones independientes con un tamaño de inserto promedio de 29 kb.

Aislamiento de clones de POMC

Dos fragmentos liberados del clon murino pHAL* con las enzimas de restricción Eco RI/Bam HI y Eco RI/Hind III de 2 y 0,9 kb respectivamente se utilizaron para buscar clones de POMC en la biblioteca previamente construida, realizando las hibridaciones en condiciones de alta estringencia (50 % formamida, 6X SSC (1X SSC (0,15 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio), 0,5 % SDS, 1mM EDTA, 10X solución de Denhardt, 100 µg/ml esperma de salmón, 25 mM buffer fosfato, pH 7,2) a 42 °C por 16 hs. Se aislaron 23 clones doble-positivos que se caracterizaron por mapeo de restricción usando 1UE/µg de ADN y compararon con el mapa publicado de pHAL* (Rubinstein *et al*, 1993).

Plásmidos

El plásmido CX11 fue construído subclonando un fragmento *ClaI / XmaI* conteniendo el exón 3 y 7 kb adicionales hacia el extremo 3', proveniente del clon genómico #13, en el vector plasmídico pbluescript (SK+/-). Para obtener CX11* se reemplazó un fragmento *ClaI / EcoRI* de 4 kb de CX11 conteniendo el exón 3, por el fragmento correspondiente del plámido HAL* que contiene el oligonucleótido heterólogo de 30 pb insertado en le exón 3 perteneciente al gen de POMC. 5'NC16 se construyó subclonando en pbluescript

un fragmento *ClaI / NotI* de 16 kb conteniendo los dos primeros exones de POMC. Ligando el inserto liberado de CX11* con *NotI* y *ClaI* al liberado de 5'NC16 con *ClaI* y *BamHI* y subclonando el producto de la ligación dentro de pbluescript linealizado con *NotI* y *BamHI*, se construyó pPOMC27* (figura 2).

El plásmido pP27*5'Δ es producto de la ligación entre un fragmento *ClaI / ClaI* proveniente de HAL* conteniendo los dos primeros exones del gen de POMC, y el plásmido CX11* linearizado

en el único sitio *ClaI*. El plásmido pP27*3'Δ fue construido ligando un fragmento *NotI / ClaI* conteniendo los exones 1 y 2 del gen de POMC proveniente del cósmido #13, con un fragmento *NotI / ClaI* proveniente de pHAL* que contiene el exón 3 y secuencias pertenecientes al vector (figura 19).

Los tansgenes POMC27* , P27*3'Δ y P27*5'Δ se liberaron de las secuencias plasmídicas con las enzimas *NotI* y *SalI*. Los tres genes se prepararon para la microinyección pronuclear como se describió anteriormente (Low, 1992).

El plásmido rEx3* utilizado para la síntesis de la ribosonda antisentido fue construido subclonando un fragmento BglII / ApaI conteniendo el exón 3 de pHAL* en el sitio de clonado múltiple del vector bluescript SK (+/-).

Producción de animales transgénicos

Animales y bioterio

Las cepas endogámicas necesarias para la obtención de embriones (C57B1/6 y CBA/J) y la cepa exogámica Swiss Webster para la obtención de hembras pseudopreñadas se encuentran en una sala exclusiva del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET). En esta sala, los animales se mantienen con un sistema de ventilación permanente, un ciclo luz/oscuridad de 12 hs (7:00 AM - 7:00 PM) y una temperatura controlada que se mantiene entre 19 y 23 °C. Los ratones reciben una

dieta comercial de mantenimiento, salvo las madres en período de lactancia que reciben una dieta más rica en proteínas y grasas.

Para obtener embriones aptos para la microinyección se aparean hembras C57B1/6 y machos CBA/J y se obtienen híbridos de primera generación (F1) B6CBF1. Los machos F1 se mantienen en jaulas individuales y se los utiliza como padrillos para fecundar hembras F1 superovuladas. La superovulación se induce en hembras B6CBF1 jóvenes (entre 4 y 5 semanas de edad) mediante un tratamiento hormonal que comienza tres días antes de la recolección de óvulos fecundados con una inyección de 5 UI i.p. de PMS (*pregnant mare serum*) a las 2 PM. Dos días más tarde los animales reciben 5 UI i.p.de hCG (*human corionic gonadotrophin*) a la 1 PM. Inmediatamente estas hembras se colocan en jaulas individuales con machos B6CBF1. A la mañana siguiente, las hembras que fueron copuladas por el macho (se verifica mediante la presencia de un tapón vaginal de semen) son sacrificadas por dislocación cervical y mediante una incisión abdominal se exponen los tractos reproductivos. Los oviductos son aislados y se colocan en una placa de 35 mm con medio Whittens precalentado en un incubador a 37 °C y 5 % CO_2. Mediante el uso de una lupa de disección, un par de forceps y un par de agujas de 25 G, se disocian los oviductos para liberar los ovocitos fertilizados rodeados por una masa de células del cumulus. Estos son aspirados con una pipeta Pasteur previamente estirada sobre una llama y se colocan en una gota de medio Whittens con 1% de hialurodinasa por 5 min para separar los embriones de las células del cumulus. Posteriormente los ovocitos se pasan a través de 4 o 5 gotas de medio Whittens y se guardan en incubador de a grupos de 20 hasta el momento de la microinyección. La cantidad obtenida de ovocitos fertilizados aptos para ser microinyectados es de aproxomadamente 20 por hembra superovulada.

Microinyección pronuclear

Para la microinyección pronuclear se utilizan micropipetas sujetadoras e inyectoras preparadas a partir de capilares de borosilicato y estiradas con un estirador vertical de micropipetas. Los ovocitos se colocan en una gota de medio Whithens equilibrado con Hepes ubicada en el centro de una depresión semiesférica convexa de un portaobjetos, se observan bajo un microscopio y se seleccionan aquellos que tengan ambos pronúcleos bien visibles. Con la ayuda de la pipeta sujetadora y un micromanipulador se introduce la pipepa microinyectora en los embriones y se descarga 1-2 pl de la solución de ADN (aproximadamente 500 moleculas del transgén/pl) dentro del pronúcleo más visible (figura 1). Los embriones microinyectados son colocados en el incubador hasta el momento de la transferencia. Se calcula que entre el 50 y el 70 % de los embriones sobrevive a la microinyección.

Transferencia embrionaria a hembras pseudopreñadas

Para obtener hembras pseudopreñadas se ponen en contacto la noche anterior a la recolección de embriones varias hembras jóvenes (entre 6 y 9 semanas) con machos vasectomizados. A la mañana siguiente se seleccionan las hembras con tapón vaginal, signo de copulación.

Las hembras pseudopreñadas son anestesiadas con avertina 300 mg/kg, i.p.. Luego de una incisión lateral de aproximadamente 1 cm y con la ayuda de una lupa, se expone el oviducto a transferir. Se rompe la membrana que recubre el oviducto, se identifica la ámpula y se inserta a través de ella una pipeta pasteur fina cargada con los embriones. Se descargan en total unos 10 a 15 embriones por oviducto. Luego de la transferencia se cierra la incisión con sutura .

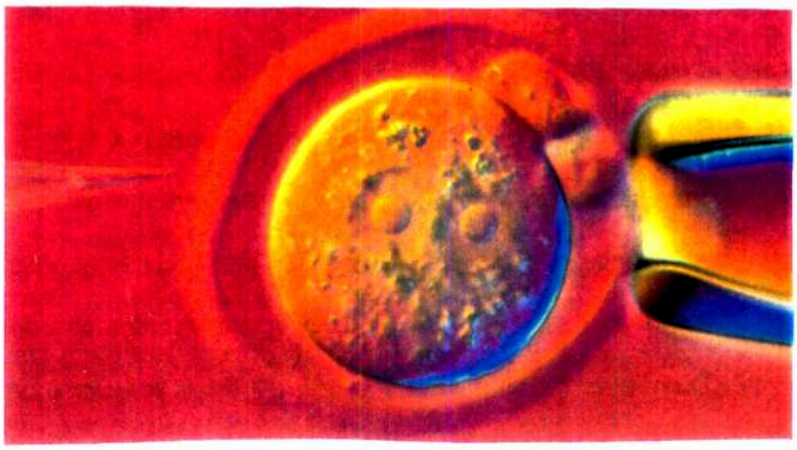


Figura 1: **Microinyección pronuclear de ovocitos fertilizados**
Fotografía de un embrión de ratón con ambos pronúcleos bien visibles en el instante previo a la microinyección pronuclear. A la izquierda se observa la pipeta sujetadora que sostiene el embrión por presión negativa. A la derecha la pipeta microinyectora cargada con una solución de ADN a punto de penetrar la zona pelúcida. Esta fotografía fue tomada en nuestro microscopio del INGEBI durante una sesión de microinyección.

Identificación de ratones transgénicos. Análisis de la presencia del transgén

Extracción de ADN

Los ratones nacidos de embriones inyectados se apartan de sus madres adoptivas a los 18-20 días y se separan por sexo. Luego de anestesiados con avertina 300 mg/kg i.p., se corta la porción terminal de la cola (0,5-1 cm) con un bisturí y se la cauteriza. Los ratones son marcados en las orejas para su posterior identificación. Los segmentos de cola se incuban a 55 °C en buffer de digestión (50 mM Tris-HCl, pH 8; 100 mM EDTA; 0.5% SDS; 0,5 mg/ml proteinasa K) durante 12-14 hs. El ADN se extrae por métodos comunes (Low, 1992). Cuando el ADN está en solución se los cuantifica espectrofotométricamente. La

presencia del transgén fue detectada por hibridización del ADN genómico con una sonda radiactiva que reconoce selectivamente al ADN foráneo (*dot blot hibridization y southern blot hibridization*) o utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos de secuencias transgénicas.

Southern Blot

10 μg de ADN genómico fueron digeridos con 50 UE de *EcoRI* y *XhoI* por 12-14 hs. Luego se realizó una digestión adicional por 2 hs agregando 20 UE de las mismas enzimas. Las digestiones fueron precipitadas con 2,5 vol. de etanol, resuspendidas en agua y sembradas en geles de agarosa 0,7 % a 3-5 V/cm. Al finalizar la corrida, los geles fueron desnaturalizados por 40 min (0,5 N NaOH; 1,5 M NaCl) con agitación suave. Posteriormente fueron neutralizados (0,5 M Tris-HCl pH 8; 1,5 M NaCl; 1 mM EDTA) 2 veces por 30 min y transferidos por capilaridad (Sambrok *et al.*, 1988) a membranas de nylon no cargadas. Luego de la transferencia se fijó el ADN a las membranas con luz UV (120 mJ/cm^2) y se hibridó como se especifica más abajo.

Dot blot

10 μg de ADN genómico obtenido de la cola de cada ratón fueron desnaturalizados a 100 °C y sembrados sobre una membrana de nylon en forma manual o mediante una cuba de tipo *mini fold* conectada a una trampa de vacío. Una vez sembradas todas las muestras, la membrana se colocó en forma sucesiva sobre papeles wattman 3MM embebidos en solución desnaturalizante (5 min) y luego en solución neutralizante (2 x 5 min.). El ADN se fijó con luz UV (120 mJ/cm^2) y se hibridó como se detalla a continuación.

Hibridación de ADN

Las sondas radiactivas se marcaron por el método de iniciación al azar (*random priming*) utilizando un kit comercial de GIBCO BRL (Rad-Prime) para el caso de fragmentos de ADN mayores que 200 pb. En el caso de oligonucleótidos, se utilizó la enzima nucleotidil transferasa terminal (TdT, GIBCO BRL). Las prehibridaciones e hibridaciones se realizaron en botellas rotatorias dentro de un horno de temperatura controlada. Las membranas se prehibridaron entre 1 y 2 hs en una solución conteniendo 25 mM buffer fosfato, pH 7,2; 6x SSC; 1 mM EDTA; 5 x Denhardt; 0,5 % SDS y 100 μg/ml de ADN de esperma de salmón. Las hibridaciones se efectuaron en la misma solución de prehibridación durante 16 hs con el agregado de la sonda previamente hervida por 5-10 min y enfriada otros 2 min en hielo. Los lavados de la membrana se realizaron a alta rigurosidad (lavado final con 0,1 X SSC a 65 °C). Una vez finalizados los lavados las membranas se expusieron en películas autoradiográficas junto con pantallas intensificadoras de señal a -70 °C. El tiempo de exposición de las películas radiográficas varió según la marca radiactiva detectada en los filtros luego de los lavados.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la identificación de animales portadores de los transgenes de POMC se utilizaron los primers M329 (5'-GAAGTACGTCATGGGTCACT-3') y M330 (5'-AGCTCCCTCTTGA ACTCTAG-3') que amplifican una banda de 180 pb para el alelo endógeno de POMC y una banda de 210 pb para el alelo transgénico de POMC (figura 5). Las condiciones de reacción fueron: 200 ng de ADN genómico en buffer PCR 1x (50 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,25 mg/ml BSA; 1mM tartrazina y 2 mM $MgCl_2$); 0,2 mM dNTPs; 2,5 μM de cada primer y 1 U de Taq polimerasa de GIBCO BRL en un vol. final de 10 μl. Las muestras se amplificaron en un termociclador de capilares Idaho 1605 como se detalla a continuación: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 0 seg, annealing a 65 °C por 10 seg y elongación a 72 °C por 15 seg y una

elongación final a 72 °C por 10 min. Los productos de elongación se corrieron en un gel de agarosa 2 % con bromuro de etidio (0,1 μg de bromuro de etidio por ml de agarosa) y se visualizaron con luz UV.

Genotipificación de ratones normales y mutantes para la producción de β-endorfina

Reacción en cadena de la polimerasa

La genotipificación se realizó utilizando en un mismo tubo de reacción los siguientes primers: 889 (5'-ACCTCCGAGAAGAGCCAG-3') , 187 (5'-GACATGTTCATCTCTA TACATAC-3') y 186 (5'-GAGGATTGGGAAGACAATAGCA-3'). El par 889-187 amplifica un producto de 1,4 kb correspondinte al alelo salvaje del gen de POMC, y el par 889-186 amplifica un fragmento de 1,2 kb que corresponde al alelo mutado de POMC. Las condiciones de reacción fueron estándar (94°C por 1 min, 60°C por 1 min, 72°C por 1 min, 35 ciclos)

Extracción de ARN

Se preparó ARN citoplasmático de hipotálamos e hipófisis individuales como se indica a continuación. El tejido se hogenizó pasándolo por una jeringa de 1 ml con una aguja de 25 G en 10 mM Tris-HCl, pH 7, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1,2 % Nonidet P-40). El extracto se centrifugó a 10000xg por 5 min a 4 °C y al sobrenadante se le agregó 1 vol de una solución conteniendo 10 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl, 5mM EDTA y 1,2 % SDS. Se extrajo con 1 vol de fenol-isoamílico-cloroformo (50:1:49) y el ARM se aisló de la fase acuosa por centrifugación luego de precipitar con EtOH 70 % y 0,3 M Acetato de Sodio. La concentración de ADN se determinó por espectrofotometría (260 nm).

Ensayo de protección a ribonucleasas.

El ARN obtenido se incubó con una sonda de ARN antisentido producida por transcripción *in vitro* del plásmido rEx3*, que contiene un inserto genómico de POMC

que incluye el exón 3 con el oligonucleótido heterólogo de 30 pb. La transcripción de la sonda linealizada con la enzima Xho I se realizó con la T7 ARN polimerasa. Para normalizar entre las muestras se utilizó una sonda antisentido del gen ß-actina de ratón. Las mezcla de reacción se desmanturalizaron por 5 min a 90°C y luego la hibridización se realizó incubando durante una noche a 43°C. El ARN simple cadena que no hibridizó se digirió con mezcla enzimática de ribonucleasas A y T1 a temperatura ambiente por 30 min. Los fragmentos protegidos de la digestión por los ARNm transcriptos desde el gen endógeno de POMC (182 bases), desde el transgén (200 bases) y desde el gen de ß-actina (300 pb) se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 5 %. Los geles se expusieron por contacto directo con placas autorradiográficas y las bandas individuales se cuantificaron determinando la densidad óptica usando un densitómetro LKB (figura 12)

Hibridización in situ de ARNm

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical, inmediatamente se extrajeron los tejidos y se congelaron en recipientes plásticos conteniendo medio de congelamiento. Para la hibridización *in situ* del desarrollo se aislaron los embriones en el estadio deseado, se extrajeron las membranas extra-embrionarias y se congelaron a -20 °C. Se realizaron cortes seriados de los tejidos utilizando un crióstato a -20 °C . Las secciones se montaron en portaobjetos previamente tratados con vectabond (Laboratorios Vector, Ca, USA), se fijaron en formalina 10 % por 30 min a temperatura ambiente y luego se realizaron 3 lavados de 10 min en PBS y 2 lavados en 2X SSC de 10 min cada uno. Los portaobjetos se dejaron drenar por 5 - 10 min y luego se prehibridaron (50 % formamida, 4X SSC, 1X Denhardt, 250 µg/ml de ARN de transferencia, 10 mM DTT, 500 µg/ml de ADN de esperma de salmón y 10 % de sulfato de dextrano) cubiertos con cubreobjetos por 1 hora a 37 °C. Luego se incubaron durante toda la noche a 37 °C con 11000 - 20000 cpm/µl de la sonda oligonucleotídica correspondiente marcada con [α] ^{35}S dATP.

Finalmente se realizaron los siguientes lavados: 1X SSC, 1mM DTT (4 X 15 min a temperatura ambiente); 2X SSC, 50 % formamida (4 X 15 min a 37 °C); 1 X SSC (3 X 20 min a temperatura ambiente). A continuación los portaobjetos se deshidrataron a través del pasaje sucesivo por etanol en concentraciones crecientes (70, 95 y 100 %; 5 min en cada pasaje) y se sumergieron en emulsión autorradiográfica (Kodal NTB3) y se expusieron por 14-19 días las de POMC y por 4 días las de oxitocina . Por último se revelaron y se tiñieron con rojo neutral. Para detectar el ARNm endógeno de POMC y el transcripto transgénico se utilizó un oligonucleótido de 30 pb antisentido de secuencias pertenecientes al exón 2 (E2- POMC: 5'-CCCTGAGCGACTGTAGCAGAATCTCC GGCAT-3') mientras que para detectar específicamente el ARNm transgénico se utilizó un oligonucleótido antisentido de la secuencia del oligonucleótido heterólogo insertado en el exón 3 (553-TG: 5'-CGCGATAGCAGACTCGAGAGCGACAGACAG-3') y para revelar únicamente el mensajero endógeno se usó una sonda oligonucleotídica antisentido de la secuencia del exón 3 que rodea el sitio de inserción del oligonucleótido heterólogo (E3-POMC: 5'-CGGAAGTGCTCCATGGAGAGCGCTTG-3'). Para la hibridización in situ de oxitocina se utilizó un oligonucleótido antisentido marcado con [α] ^{35}S dATP, complementario al mensajero de oxitocina de ratón.

Colocalización del ARNm transgénico y la presencia del péptido ß-endorfina

La detección *in situ* simultánea de β-endorfina y del ARNm transgénico se realizó por medio de hibridización *in situ* utilizando la sonda 553-TG seguida por inmunohistoquímica utilizando un antisuero anti-β-endorfina. Los portaobjetos ya hibridados con la sonda radiactiva como se indica en la sección "Hibridización *in situ* de ARNm" se lavaron en PBS (2 X 45 min), KPBS (1 X 30 min) y se incubaron en H_2O_2 1 % en KPBS por 20 min. Luego se lavaron en KPBS (3 veces por 5 min) y se preincubaron por 2 hs en 0,3 % Tritón X-100, 2 % suero normal de cabra en KPBS. Luego se incubaron durante toda la noche a 4 °C con la dilución apropriada del antisuero anti-ß-endorfina

(1/1000 en 0,3 % Tritón X-100, 2 % suero normal de cabra en KPBS). El antisuero se lavó en KPBS (2 x 20 min) y los complejos antígeno-anticuerpo se incubaron con una solución de inmunoglobulinas biotilinada anti-conejo hechas en cabras (1/200 en 0,3 % Tritón X-100 en KPBS) por 2 hs a temperatura ambiente, y luego de un lavado de 20 min en KPBS se incubaron por 1 hora con avidina-peroxidasa (1/1000 en 0,3 % Tritón X-100, 0,1 % BSA en KPBS). Finalmente se lavaron en TBS y se incubaron en una solución contenientdo 25 mg/ml de diaminobencidina en TBS, 0,05 % H_2O_2. La reacción fue detenida sumergiendo los portaobjetos en TBS. Luego de deshidratar los potaobjetos en alcohol con concentraciones crecientes (70, 95 y 100 %), se les colocaron cubreobjetos utilizando permount como adhesivo.

Procedimientos quirúrgicos

Las operaciones de cirugía se realizaron bajo anestesia por inyecciones intraperitoneales de tribromoetanol (300 mg/kg). Los ratones adrenalectomizados (ADX) se suplementaron con NaCl 0,9% o recibieron una dosis de reemplazo de dexametasona (50μg/ml en NaCl 0,9%) por 5 días en la bebida, cuando se los sacrificó y se les extrajeron los tejidos de interés. Los animales castrados se sacrificaron 4 semanas después de la operación. Para los estudios ontogénicos, se sacrificaron por dislocación cervical hembras con tiempo de preñez controlado a partir de la presencia de tapón vaginal en la mañana de lo que se considera el día e0,5. Los embriones fueron extraídos a intervalos de 1 día, a partir del día e9,5 y se corroboró la edad por una examinación macroscopica. La extracción de los órganos y depósitos grasos para su posterior pesado se realizó inmediatamente después de sacrificar los ratones por dislocación cervical.

Determinaciones en suero

Cuantificación de los niveles de leptina en suero

Muestras de suero de 100 µl obtenidas de ratones macho, alimentados *ad libitum* (n=32) o privados de alimento por 16 hrs (n=32), fueron analizadas por duplicado para medir el contenido de leptina por radioinmunoensayo, utilizando un equipo adquirido a Linco Research, que usa anticuerpo fabricado contra leptina de ratón purificada. Se utilizó leptina de ratón como estándard. El ensayo tiene una sensibilidad de 0,2 ng/ml y coeficientes de variación de 7,2 y 7,8 % intra e interensayos, respectivamente. No presenta reacciones cruzadas.

Cuantificación de los niveles de insulina en suero

Se determinaron por duplicado los niveles de insulina en muestras de 100 µl de los mismos grupos de ratones arriba comentados, utilizando un equipo de radioinmunoensayo con insulina de rata como estándard.

Comportamiento materno

Estudios de adopciones cruzadas

Para el ensayo de cruzamientos recíprocos, se utilizaron únicamente crías nacidas en la misma noche. Todas las crías fueron colocadas en el "nido" de la hembra receptora.

Recuperación de crías

Crías de 3, 7 u 11 días fueron separadas de sus madres por 3 horas y luego 3 de ellas fueron colocadas cada una en una esquina de la jaula distinta que la ocupada por la madre. Durante 15 min. se observó el comportamiento de las madres y se registró la latencia de recuperación de las crías, cantidad de estas recuperada, latencia de reinicio del amamantamiento y el tiempo que permanecen apoyadas sobre las crías una vez que

han sido recuperadas. La recuperación de las crías fue observada, no inferida ya que las crías podrían dirigirse al nido por sus propios medios.

Cuantificación de la ingesta de leche

Se cuantificó la leche ingerida por las crías durante 15 minutos. La succión fue inducida separando las crías de su madre por 1 hora, al cabo de la cual fueron reubicadas en la jaula luego de ser pesadas. Se consideró como tiempo 0 el momento en que al menos 3 de las 5 crías empezaron a amamantarse. Luego de 15 minutos de succión las crías volvieron a ser separadas de la madre y pesadas nuevamente. La cantidad de leche ingerida se estimó a partir del aumento de peso alcanzado durante esos 15 minutos. Crías que no fueron reunidas con su madre fueron pesadas conjuntamente con aquellas que sí fueron reunidas y vueltas a separar.

Paradigma de estrés por inmovilización

El estrés se aplicó por inmovilización de los ratones manteniendolos dentro de tubos plásticos de 2,5 cm de diámetro durante 1 hr por 5 días consecutivos. Los ratones control se manipularon de la misma manera, es decir que se retiraron de la jaula por el mismo intervalo de tiempo, pero fueron introducidos en los cilindros plásticos sino en una jaula diferente.

Administración de drogas

Los ratones transgénicos para POMC27* se inyectaron subcutaneamente dos veces por día (a las 7 y a las 19 hs) con 1mg/kg de apomorfina, con 1mg/kg de haloperidol, o con el vehículo de las drogas por 5 días. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical 1 hr después de la última inyección.

RESULTADOS Y DISCUSION

Parte 1. Identificación de las secuencias regulatorias necesarias para dirigir la expresión específica neuronal del gen de POMC.

1. *Objetivo específico*

Para estudiar la regulación de la expresión tejido-específica del gen de POMC se requiere de un sistema de expresión fidedigno en donde la transcripción se inicie específicamente a partir del reconocimiento de secuencias regulatorias por factores presentes en un determinado tipo celular. En trabajos anteriores varios grupos habían utilizado transfecciones en células hipofisiarias de fenotipo corticotrófico (AtT20) y ratones transgénicos expresando genes reporteros o el propio gen de POMC (ver introducción). La falta de expresión de estos transgenes en neuronas del núcleo arcuato del hipotálamo sugiere la existencia de, al menos, un elemento específico de expresión neuronal en una región del gen de POMC alejado de las secuencias codificantes.

Con el objetivo de identificar estas secuencias regulatorias activas en neuronas decidimos aumentar las secuencias genómicas disponibles del locus del gen de POMC, para ser utilizadas en la construcción de transgenes de gran tamaño, que podrían contener los elementos necesarios para la correcta expresión de POMC en todos los tipos celulares incluido el neuronal.

1.1. *Construcción de una biblioteca genómica de ratón*

Con este propósito se preparó una biblioteca genómica de ratón utilizando ADN células embrionarias no diferenciadas de ratones 129/SvEv (D3). Se usó el vector cosmídico s-cos 1 porque es capaz de albergar fragmentos genómicos de hasta 45 kb. El vector s-cos 1 contiene un único sitio de clonado, *BamHI* , y la mayoría de los insertos genómicos pueden ser liberados como un único gran fragmento de restricción utilizando los sitios de restricción para *Not I* que flanquean al sitio *Bam HI.*

El vector fue linearizado con *Xba I* y sus extremos defosforilados con fosfatasa alcalina de intestino bovino para prevenir la autoligación. El cósmido lineal fue luego digerido con *BamHI*, generando dos fragmentos de 1,1 y 6,5 kb.

Para la preparación del ADN genómico se tuvo especial cuidado, ya que resulta crítico contar con fragmentos de ADN de gran tamaño (~150 kb) antes de someterlo a una digestión parcial con *Mbo I* (deja extremos compatibles con los generados por *Bam HI*) para ser ligado a los extremos del cósmido producidos por acción de la enzima *Bam HI.* Para determinar las condiciones óptimas de digestión (fragmentos de 30-45 kb) se incubaron 10 μg de ADN con 0,5 unidades de *MboI* durante 5, 11, 20, 30 y 60 min. Finalmente 100 μg de ADN fueron digeridos durante 5 min. con 5 unidades de *MboI* y fueron luego defosforilados para evitar la formación de concatémeros. Los productos de la ligación entre estos fragmentos de ADN genómico y los fragmentos derivados del vector s-cos 1 fueron empaquetados *in vitro* utilizando extractos de empaquetamiento Gigapack II (Stratagene, Ca, USA). La biblioteca fue amplificada en bacterias NM554, y el título final fue de 10^5 clones independientes de un tamaño promedio de 35 kb.

1.1.2. *Screening de la biblioteca genómica utilizando sondas de POMC*

El rastreo de clones genómicos de POMC se realizó en esta biblioteca utilizando como sondas dos fragmentos contenidos en HAL*, uno de 2 kb perteneciente al extremo 5', liberado de HAL* con *Eco RI* y *Bam HI* (A) y otro del extremo 3' de 900 pb, liberado de HAL* con *Eco RI* y *Hind III* (B) (figura 1). Estos fragmentos fueron marcados por el método de iniciación al azar con $[\alpha]^{32}P$ dCTP. La hibridización se realizó en condiciones de alta rigurosidad y se aislaron 23 clones positivos para las dos sondas. No se halló ningún clon que hibridara diferencialmente con alguna de ellas. Se confirmó mediante mapeo de restricción la presencia de secuencias del gen de POMC. Luego se realizó un mapeo intensivo de los clones mediante la técnica de *Southern blot*, utilizando las sondas iniciales y otras obtenidas de los fragmentos recientemente clonados y de secuencias del vector cosmídico. Se identificaron los dos clones que más se extendían hacia los lados 5' (clon #13) y 3' (clon #1). Ambos clones se extienden a través de la unidad transcripcional completa del gen de POMC (6 kb) más 13 y 26 kb de secuencias flanqueantes 5' y 3' respectivamente (figura 1).

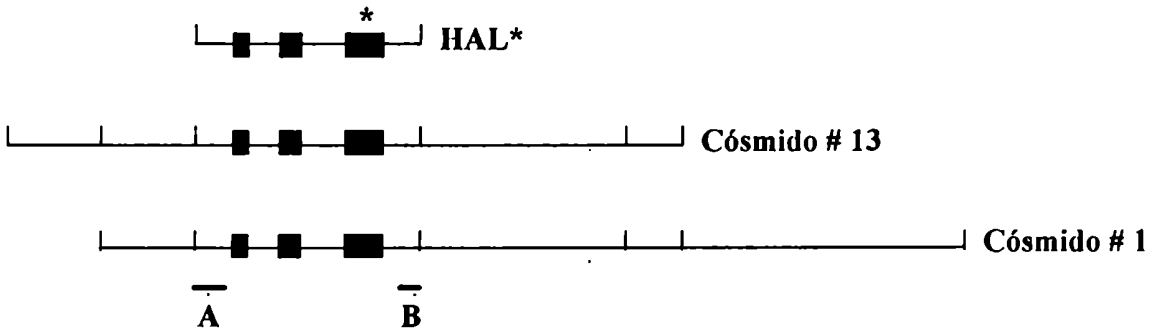


Figura 1. Esquema de HAL* y de los clones obtenidos en el *screening* de la biblioteca genómica.
HAL* es un fragmento genómico que contiene la unidad transcripcional del gen de POMC con 2 kb de secuencias flanqueantes a ambos lados, previamente utilizado para generar ratones transgénicos y su expresión en neuronas hipotalámicas de POMC había resultado negativa (Rubinstein et al., 1993).Las cajas negras indican secuencias exónicas. A y B indican las posiciones de las sondas usadas para el screening. El oligonucleótido heterólogo de 30 bp insertado en el único sitio para la enzima *Nco I* presente en el exón 3, se representa con un asterisco (*).

1.2. *Subclonado de los cósmidos conteniendo secuencias pertenecientes al gen de POMC*

Para la construcción de transgenes se realizó el subclonado del cósmido #13 de tal manera de poder aprovechar el oligonucleótido heterólogo de 30 pb insertado en HAL*, que permite diferenciar al transgén del gen de POMC endógeno. Para esto subclonamos el cósmido #13 en HAL*. El subclonado realizado es el esquematizado en la figura 2.

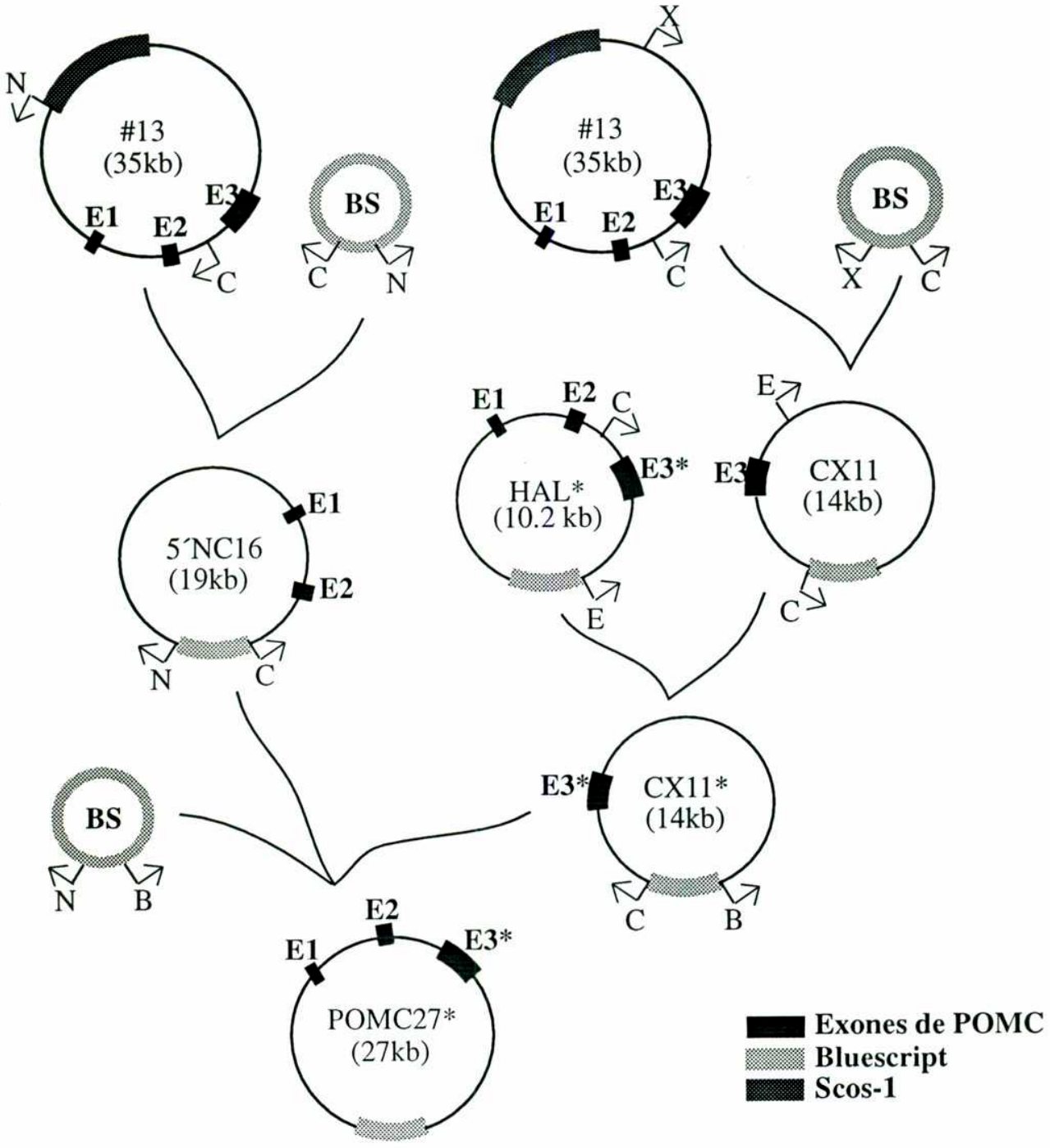


Figura 2. Subclonado del clon #13 en Bluescript (SK+/-) para generar pPOMC 27*. Las cajas negras representan los exones de POMC. Las flechas partidas indican los sitios de corte. N: *Not I*, C: *Cla I*, X: *Xma I*, B: *Bam HI*.

2. *Generación de animales transgénicos*

Esta estrategia de subclonado permitió obtener POMC27*, un clon genómico de POMC de 27 kb "marcado" con un oligonucleótido heterólogo de 30 pb en el tercer exón. El inserto fue liberado de este plásmido utilizando las enzimas *Not I* y *Sal I*. El transgén POMC27* separado del vector por electroforesis en agarosa y purificado tal como se detalla en la sección Materiales y Métodos se microinyectó en uno de los pronúcleos de ovocitos fertilizados obtenidos de hembras B6CBF1, los cuales fueron transferidos al tracto reproductivo de hembras Swiss Webster pseudopreñadas por machos vasectomizados. A los ratones nacidos de estas hembras se les extrajo el ADN de la porción terminal de la cola a las 3 semanas de vida. Uno de estos ratones, el # 12, fue identificado como portador del transgén mediante la hibridización de un *dot blot* con el oligonucleótido 553-TG (que reconoce las 30 bp insertadas) marcado con $[\gamma]^{32}P$ ATP en el extremo 5' (Figura 3).

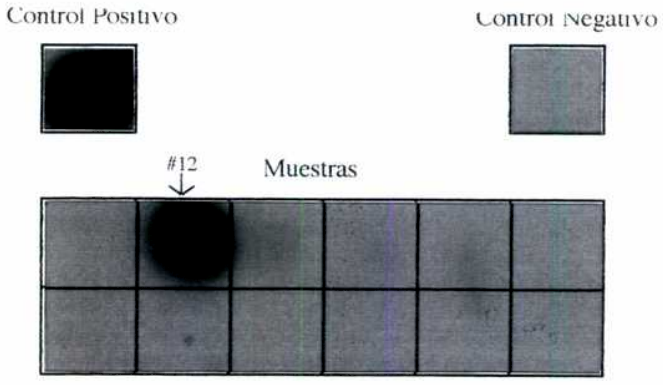


Figura 3 . Dot Blot de ADN genómico obtenido de las colas de ratones provenientes de cigotas microinyectados.
1-12: ADN proveniente de ratones Fo. Control Positivo: ADN proveniente de HAL*. Control negativo: ADN de un ratón normal.

La integración del transgén fue confirmada por análisis de *Southern blot* de ADN genómico digerido con *Eco RI* y *Xho I*, utilizando la sonda B (figura 4). El oligonucleótido heterólogo insertado en el exón 3 contiene un sitio *XhoI*, único en la región de POMC comprendida entre los sitios *Eco RI*. Esto permite diferenciar por sus tamaños a las bandas marcadas por la sonda 3' provenientes del gen endógeno (10,2 kb) y del transgén (2,6 kb) luego de la doble digestión. (figura 4).

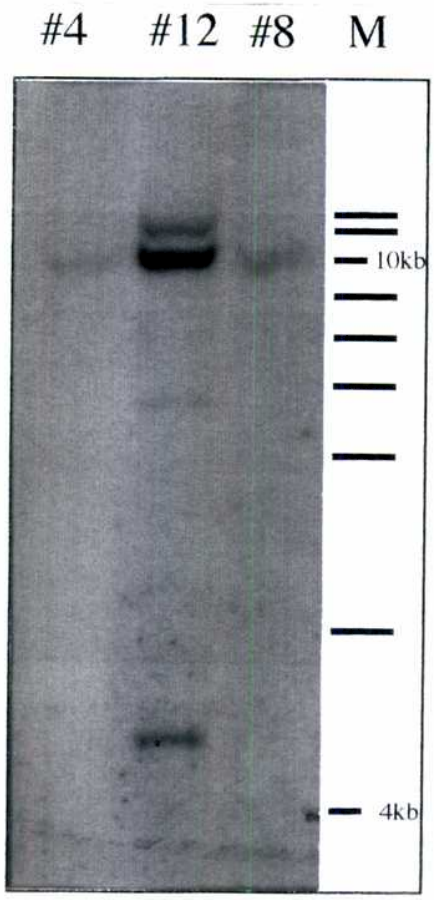


Figura 4. Análisis de Southern blot para observar el patrón de integración.
10 μg de ADN proveniente del ratón #12 y de ratones no transgénicos (# 4 y 8) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Eco RI* y *Xho I*. La sonda utilizada fue B. M: Marcadores de peso molecular (1 kb ladder, Gibco BRL).

Se puede observar en la figura 4 la presencia de una banda de 2,6 kb en la calle correspondiente al DNA del ratón #12, (también que la digestión de Xho I fue parcial, ya que la señal perteneciente al gen endógeno es mayor en la calle correspondiente al ratón # 12 que en el resto de las calles, indicando una sumatoria con la señal correspondiente a la hibridación de las moléculas del transgén que no fueron digeridas por Xho I). Se confirmó también la existencia de este ratón transgénico con la técnica de PCR usando los primers M329 y M330 que amplifican la región del exón 3 de POMC donde fue insertado el oligonucleótido diferenciador. Esta amplificación genera dos productos cuya diferencia en tamaño (30 pb) corresponde a la amplificación de secuencias que incluyen al oligonucleótido heterólogo (figura 5).

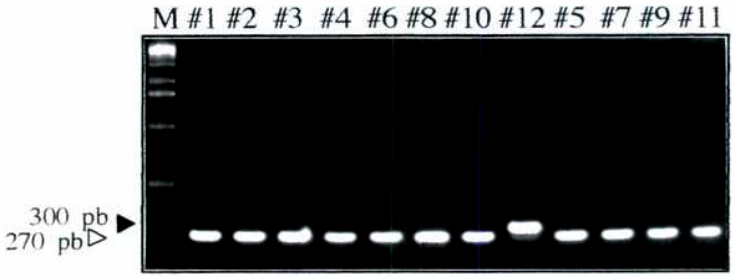


Figura 5. PCR de ADN de colas
#1-12 ADN de ratones #1-12. M: Marcadores de peso molecular.

El ratón # 12 (Fo) fue apareado con hembras de exocría Swiss Webster para expandir la línea transgénica. Aproximadamente el 50 % de los ratones F1 heredaron el transgén,

indicando una herencia mendeliana y que la integración del transgén se realizó en un único sitio del genoma. Para calcular la cantidad de copias del transgén integradas al genoma se sembró una misma cantidad de ADN de ratones homocigotas y heterocigotas para el transgén y de ratones normales, y se hibridó con una sonda complementaria al exón 2 del gen de POMC. Por la intensidad de la señal se determinó que se integraron aproximadamente de 4 a 6 copias del transgén (figura 6).

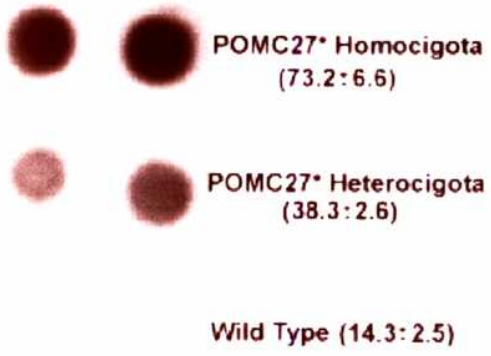


Figura 6. Dot blot cuantitativo.

3. *Caracterización de la expresión de POMC27* en ratones transgénicos*

El patrón de expresión de POMC27* fue establecido por hibridización *in situ* de ARNm en cortes coronales de 16 μm, aprovechando la inserción del oligo de 30 pares de bases presente en el exón 3 del gen de POMC. Las sondas utilizadas fueron:

a) E3-POMC, un oligonucleótido de 30 bases que hibridiza con la nucleótidos del exón 3 de POMC que flanquean al sitio de inserción del oligonucleótido heterólogo;

b) 553-TG, un oligonucleótido diseñado para hibridar con la secuencia de 30 bp insertada en el exón 3; y

c) E2-POMC, una sonda de 30 pares de bases antisentido del exón 2 del gen de POMC que hibridiza tanto con el ARNm endógeno de POMC como con el ARNm transgénico (figura 7).

Figura 7. Estrategia de hibridización utilizada para revelar los mensajeros de POMC y POMC 27* mediante sondas de oligonucleótidos. La hibridización in situ se realizó utilizando los oligonucleótidos E2-POMC (cuadrado azul), E3-POMC (cuadrado verde) y 553-TG (cuadrado rojo); que hibridizan con secuencias pertenecientes a los mensajeros de POMC (E2-POMC y E3-POMC) y de POMC27* (E2-POMC y 553-TG). Las cajas blancas rotuladas E1, E2 y E3 representan los exones del gen de POMC, las zonas coloreadas indican las secuencias reconocidas por las sondas. El óvalo rojo con asterisco representa el oligonucleótido de 30 pb insertado en el exón 3.

E3-POMC fue diseñado para detectar únicamente al mensajero endógeno, y esto fue confirmado mediante la hibridización de ADN proveniente de ratones normales y transgénicos con este oligonucleótido y con E2-POMC, que reconoce a ambos genes. Se puede observar en la figura 8 que la intensidad de la señal obtenida luego de hibridar cantidades comparables de ADN con E3-POMC es equivalente en ambos genotipos, indicando que esta sonda no reconoce un aumento en el número de copias de este gen, mientras que la señal obtenida luego de hibridar con E2-POMC es mayor en el caso del ADN proveniente de ratones transgénicos.

Figura 8. Dot blot utilizado para validar la utilización de los oligos.

3.1. *Hipófisis*

El patrón de expresión de POMC27* en la hipófisis fue estudiado por hibridización *in situ*. La sonda 553-TG marca de manera uniforme y completa los melanotrofos del lóbulo intermedio, patrón idéntico al observado para el ARNm endógeno de POMC (figura 9). En el lóbulo anterior se observa una clara diferencia entre los niveles de expresión de POMC27* y los del gen endógeno de POMC, ya que utilizando la sonda 553-TG sólo se detectó el mensajero transgénico en algunos cotricotrofos mientras que usando la sonda E2-POMC se marcaron numerosas células corticotróficas en este lóbulo de la hipófisis (figura 9). Estos resultados coinciden con lo observado anteriormente para HAL* (Rubinstein *et al*, 1993).

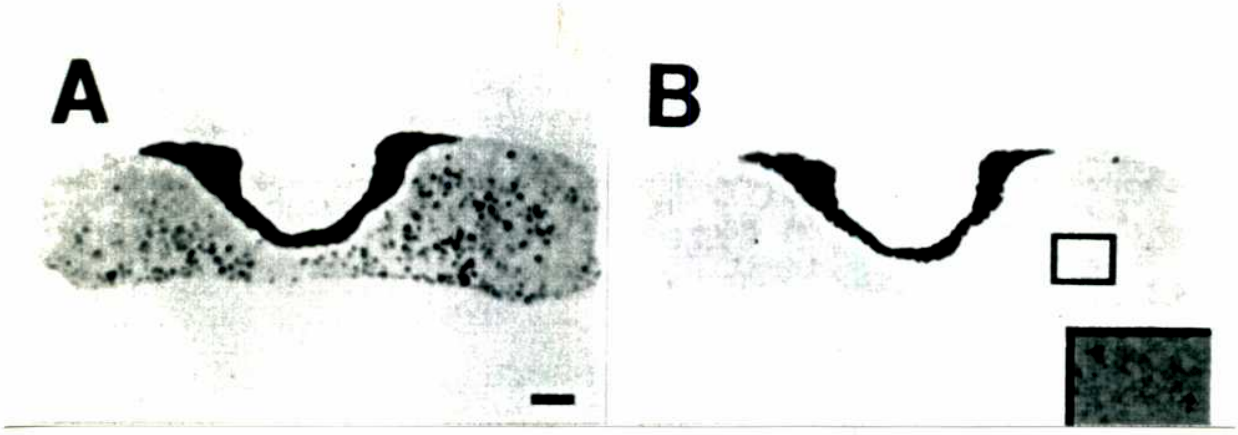


Figura 9. Expresión de POMC 27* en la hipófisis de ratones transgénicos.

Esto parece indicar que si bien POMC27* tendría una deficiencia en un *enhancer* basal para corticotrofos, contendría igualmente los elementos que le confieren especificidad hipofisaria. Estos resultados sugieren que las 16 kb adicionadas a HAL*, no aportan elementos importantes para la expresión de POMC en la hipófisis, ya que no se observaron diferencias entre los transgénicos para HAL* y los transgénicos para POMC27* en cuanto a su expresión en células endócrinas.

3.2. *Expresión de POMC27* en el cerebro*

3.2.1. *Hibridización in situ*

La hibridización *in situ* en cortes coronales de cerebro de ratones transgénicos para POMC27* utilizando la sonda 553-TG reveló un número discreto de neuronas en el núcleo arcuato del hipotálamo medio basal expresando el ARNm transgénico que se correlaciona topográficamente con las neuronas positivas observadas utilizando las sondas E2-POMC y E3-POMC. (figura 10)

La expresión de POMC27* en el cerebro fue substancialmente diferente a la observada anteriormente utilizando regiones flanqueantes del gen de POMC de menor longitud, ya que sólo se había detectado expresión ectópica con HAL* (10.2 kb) en el hipocampo (Rubinstein *et al*, 1993). Este resultado sugiere una expresión apropiada del transgén POMC27* en neuronas de POMC.

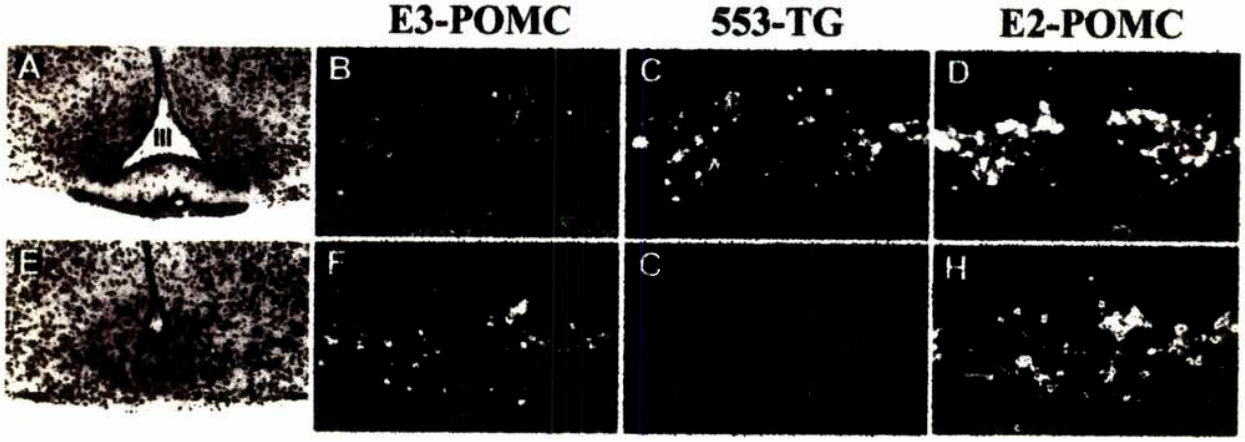


Figura 10. Localización de la expresión de POMC y POMC27* en secciones de cerebro por hibridización in situ.

Secciones seriadas de cerebro (16 μm) a nivel del hipotálamo medio basal de ratones transgénicos (A-D) y no transgénicos (E-H) fueron hibridizadas con las sondas oligonucleotídicas marcadas en su extremo 3'con una cola de póli $[\alpha]^{35}S$ dATP. La sonda E3-POMC detectó únicamente el mensajero endógeno de POMC (B, F). La sonda 553-TG detectó sólo al mensajero transgénico (C,G) y la sonda E2-POMC reconoció ambos mensajeros (D, H). En las microfotografías de campo oscuro se puede observar la expresión endógena y del transgén en el núcleo arcuato del hipotálamo. La arquitectura celular de esta región del cerebro se muestra en las fotografías de campo claro coloreadas con rojo neutral (A,E). Magnificación: 40 X

3.2.2. *Ensayo de colocalización*

Los experimentos de hibridización *in situ* mostraron expresión de POMC27* en el cerebro únicamente en neuronas de la región hipotalámica. Para confirmar que las neuronas del núcleo arcuato que expresan el transgén son neuronas que expresan POMC, se realizaron ensayos de colocalización del ARNm de POMC27* y de la presencia del péptido β–endorfina. Para esto se realizó un análisis simultáneo de inmunohistoquímica e hibridización *in situ* de ARNm en secciones de 50 μm de cerebro de ratones transgénicos. Las secciones fueron procesadas para la inmunodetección de β–endorfina por el método de avidina-biotina y luego hibridadas con la sonda 553-TG marcada con $[\alpha]^{35}$S dATP.

Se observó una correlación perfecta entre la presencia de β–endorfina revelada por inmunohistoquímica y del ARNm transgénico marcado por su hibridización con la sonda 553-TG. Todas las células que resultaron reveladas por la sonda 553-TG fueron positivas para la inmunohistoquimica, lo que demuestra una auténtica expresión neurona-específica de este transgén y ausencia de expresión ectópica. (figura 11).

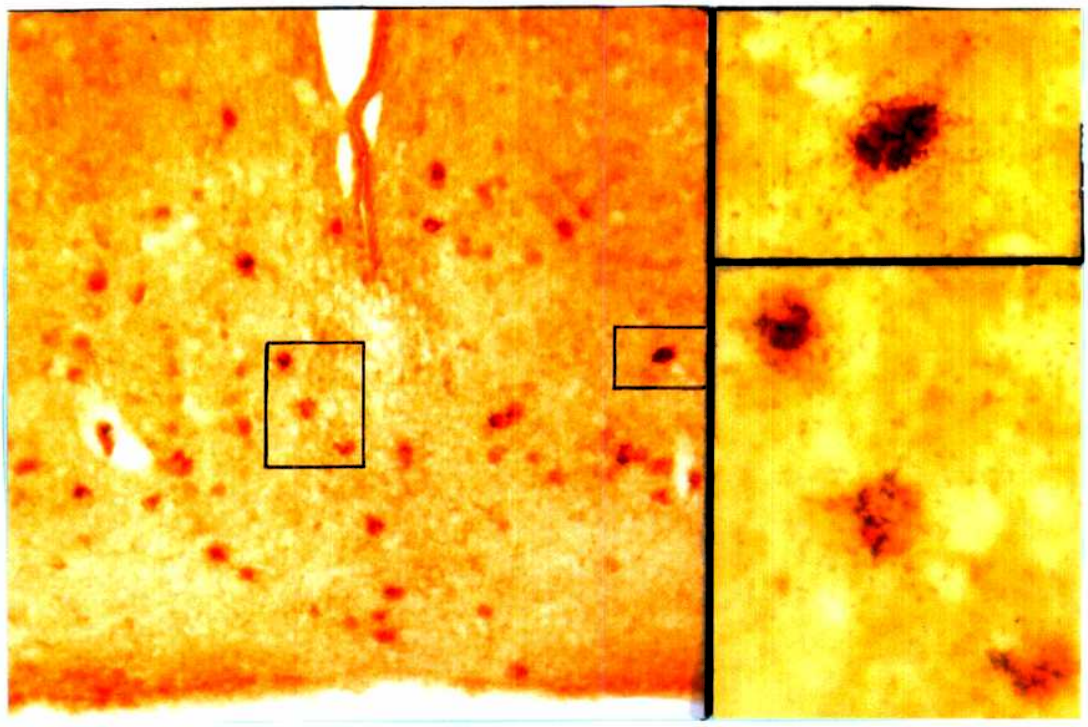


Figura 11. Colocalización de inmunoreactividad para β–endorfina y del ARNm de POMC27* en neuronas de POMC.
Cortes coronales de 50 μm de cerebro de ratones transgénicos a la altura del hipotálamo medio basal fueron hibridados con la sonda 553-TG y luego incubados con un anticuerpo policlonal anti ß-endorfina. La inmunoreactividad fue detectada mediante diaminobenzidina como se describe en Materiales y Métodos. Magnificación: 100 X. Los recuadros muestran áreas representativas del núcleo arcuato. Magnificación: 400 X

3.3. *Análisis cuantitativo de la expresión de POMC27**

La cuantificación relativa entre los niveles de expresión del mensajero de POMC y el mensajero de POMC27* por hibridización *in situ* no fue definitiva porque como se puede ver utilizando las sondas E2-POMC y E3-POMC en ratones normales, la accesibilidad al mensajero de POMC parece no ser la misma en ambos exones. Por esta razón, para poder comparar los niveles de expresión de estos dos mensajeros en una misma muestra, se desarrolló un ensayo de protección a la RNAsa A y T1, diseñado de forma tal que permite cuantificar simultáneamente las dos especies de ARNm en una única muestra de tejido, tal como se muestra en la figura 12. La presencia de la secuencia heteróloga de 30

bp insertada en la región codificante del tercer exón de POMC27* posibilita la utilización de una única ribosonda de 214 nucleótidos que puede ser protegida de la degradación por las RNAsas simultáneamente por los mensajeros de POMC y de POMC27*. La diferencia de tamaño de las bandas protegidas por cada uno de los ARN mensajeros (15 bases, que corresponden a la presencia o ausencia de las secuencias del oligonucleótido heterólogo) permite su separación en un gel de poliacrilamida. El estudio densitométrico de estas bandas permite realizar un análisis cuantitativo de la expresión relativa de ambas especies de ARNm (figura 12).

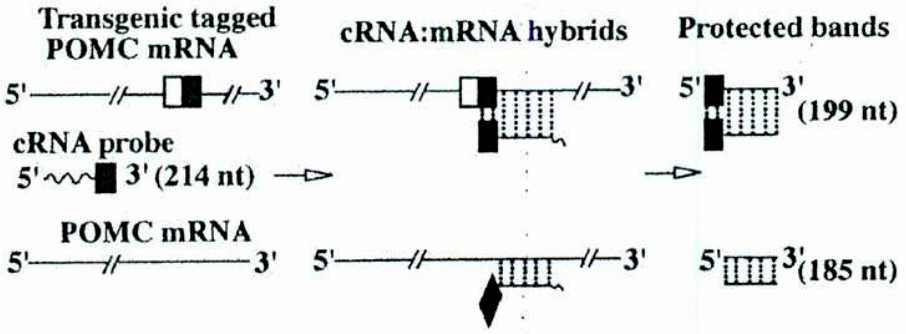


Figura 12. Diagrama del ensayo de protección a RNasas.
Los cuadrados representan la secuencia heteróloga de 30 pares de bases insertada en el exón 3.

La cuantificación por densitometría de las bandas protegidas en este ensayo indicó que la relación entre los niveles de expresión del ARNm transgénico y el del ARNm endógeno de POMC fue 0.98 ± 0.08 y 0.23 ± 0.09 en los lóbulos intermedio y anterior de la hipófisis, respectivamente. Los cocientes observados en hipotálamos individuales fueron

variables entre 0.6 y 1.6. Esta variabilidad puede deberse a una contaminación involuntaria con células hipofisarias durante el proceso de disección de los hipotálamos (figura 13).

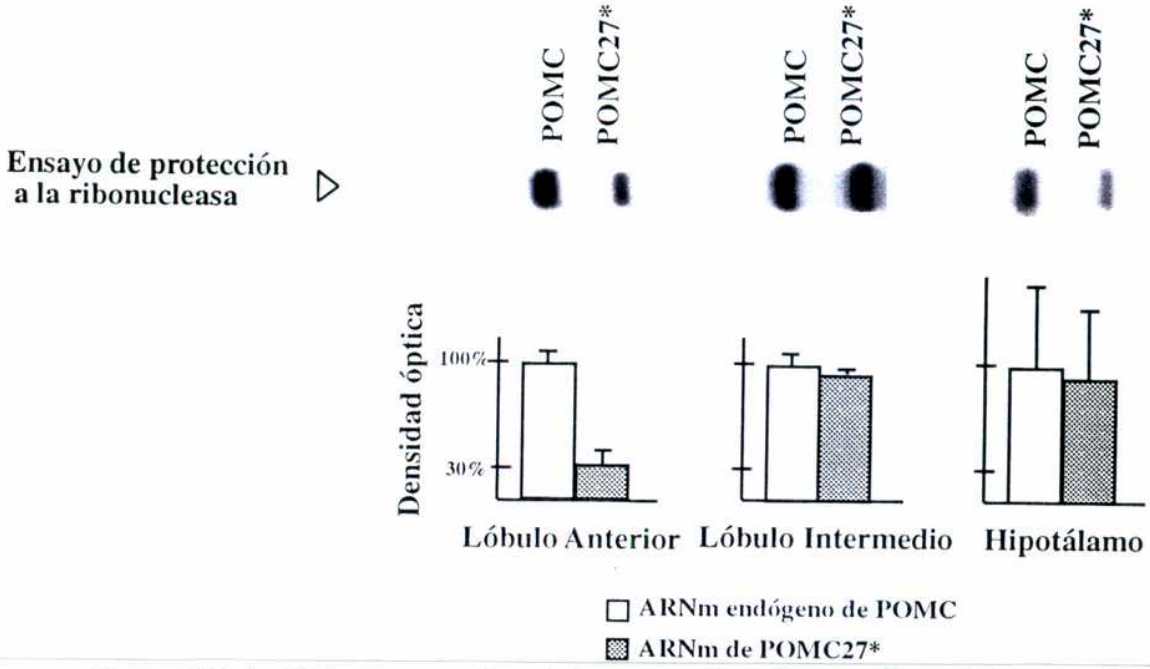


Figura 13. Análisis comparativo de la expresión del transgén y del gen endógeno de POMC por RPA. La cuantificación se realizó en al menos 5 experimentos independientes. Se muestran las bandas protegidas de uno de estos ensayos.

3.4. *Especificidad tisular de la expresión de POMC27**

El patrón de expresión espacial de POMC27* se realizó mediante el ensayo de protección a la RNAsa con RNA citoplasmático total obtenido de una variedad de tejidos, detallados en la figura 14. La expresión de POMC27* coincidió perfectamente con la expresión endógena en los tejidos testeados, con excepción de piel, ovario y suero, en los que se observó únicamente expresión a partir del gen endógeno. No se observó ninguna de estas dos bandas cuando se utilizó RNA obtenido de hígado, músculo esquelético y corazón. Todas las muestras fueron incubadas simultáneamente con una ribosonda para

β–actina, como control interno. Los niveles de expresión de ambos genes son comparables, salvo en testículo donde se observó una mayor expresión del transgén y en el lóbulo anterior de la hipófisis donde se observó lo contrario (figura 14). En conclusión, no se observó expresión ectópica alguna de POMC27*.

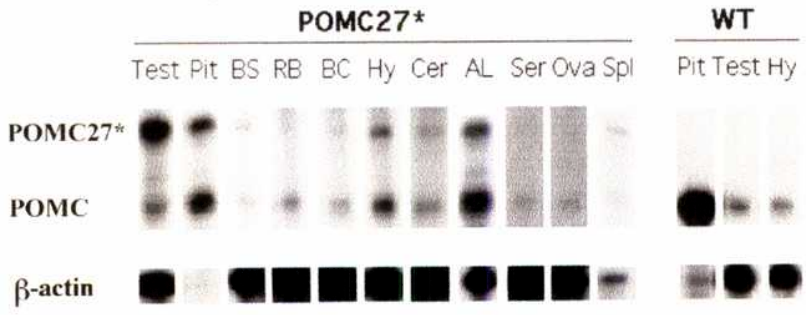


Figura 14. Detección simultánea de los mensajeros de POMC y POMC27* en distintos tejidos de ratones transgénicos.
Se realizó el ensayo de protección a RNAsas en muestras de RNA citoplasmático aislado de distintos tejidos de ratones transgénicos y controles. Una ribosonda de β–actina fue incluida en todas las reacciones como control interno.
La cuantificación se realizó en al menos 5 experimentos independientes. Se muestran las bandas características de estos ensayos.

3.5. *Regulación hormonal de la expresión de POMC27**

La regulación de la expresión del gen de POMC por neurotransmisores y hormonas es muy importante. Con el objeto de determinar si los elementos presentes en POMC27* eran capaces de dirigir su expresión de manera regulable, se realizaron los experimentos que se detallan a continuación.

3.5.1. *Hipófisis*

La expresión de POMC está tónicamente inhibida en los melanotrofos del lóbulo intermedio de la hipófisis por la liberación de dopamina tuberoinfundibular. En cambio en los corticotrofos del lóbulo anterior la expresión de POMC es regulada negativamente por glucocorticoides. Para estudiar la respuesta de POMC27* a la inervación dopaminérgica, se trató a los ratones transgénicos con el antagonista D2 haloperidol en forma prolongada (2 inyecciones diarias de 5 mg/kg durante 5 días). Los niveles de expresión de ambos genes aumentaron dos veces en el lóbulo intermedio. Esta determinación se realizó tanto por hibridización *in situ* (figura 15) como por el ensayo de protección a la RNAsa. Sin embargo, la administración de apomorfina, agonista dopaminérgico mixto D1/D2, también durante cinco días (5 mg/kg, 2 veces por día) no modificó los niveles de los mensajeros en los melanotrofos. El análisis densitométrico determinó que los niveles de las bandas protegidas por POMC y POMC27* fueron casi idénticos en los animales tratados y en los controles. Estos resultados sugieren que la transcripción del transgén también se regula por neurotransmisión dopaminérgica en los

melanotrofos. Los niveles de expresión de las dos formas de POMC no fueron modificadas en el lóbulo anterior ni en el hipotálamo por los agentes dopaminérgicos (dns).

A continuación se analizaron los efectos de la ausencia de glucocorticoides (adrenalectomía bilateral) y de la administración exógena de altos niveles de reemplazo (dexametasona) en la regulación transcripcional de POMC y POMC27* en la hipófisis.

A pesar de la diferencia observada en los niveles basales de expresión de los dos genes en el lóbulo anterior, los niveles de POMC27* fueron incrementados (tres veces) en la misma localización topográfica y en paralelo con los observados para POMC luego de practicarles adrenalectomía bilateral. En animales adrenalectomizados (ADX) con reemplazo de dexametasona en la bebida durante 5 días (50 μg Dexalergin/ ml solución salina) se puede observar una inhibición casi total de la expresión del transgén en el lóbulo anterior que se correlaciona con la observada para el gen endógeno (figura 16). Estos resultados indican que la posible falta de un enhancer basal para corticotrofos no tiene consecuencias en la regulación transcripcional de este transgén por glucocorticoides.

3.5.2. *Cerebro*

Estudiamos también la regulación de la expresión de POMC 27* en el núcleo arcuato del hipotálamo. Se sabe que las neuronas hipotálamicas que producen un determinado péptido son estimuladas por diferentes neurotransmisores dependiendo del circuito fisiológico en el que estén involucradas. Experimentos bioquímicos y farmacológicos sugieren que el control negativo de la secreción hipotalámica del factor liberador de

gonadotrofinas (GnRH) ejercida por los esteroides gonadales opera a través de un mecanismo que involucra a los péptidos opioides, más precisamente a ß-endorfina (Li y Pelletier, 1993). Se ha postulado, a su vez, que estos esteroides modulan la expresión hipotalámica del gen de POMC (Matera y Wardlaw,1994; Yang y Lim,1995). Para averiguar si el transgén también presenta una regulación transcripcional mediada por esteroides sexuales, se realizó el ensayo de protección a la acción de las RNAsas (descripto en 3.3.) en muestras de ARN hipotalámico de ratones transgénicos para POMC27* depletados de esteroides gonadales por castración. Los animales fueron castrados 4 semanas antes del sacrificio. A diferencia de lo reportado en ratas, no hemos observado modificaciones significativas en los niveles de expresión de ninguno de los dos mensajeros en ratones. Esto no excluye la participación de los esteroides en la regulación hipotalámica de POMC ya que el ARN utilizado fue extraído de hipotálamo total y dicha regulación podría ser ejercida solamente por un subconjunto específico de neuronas de POMC (figura 17).

Varios tipos de estrés estimulan la liberación de péptidos hipofisarios derivados de POMC, además se ha visto que la expresión del ARNm de POMC en el hipotálamo se ve alterada durante y al finalizar los paradigmas de estrés, y se postula que esta expresión estaría involucrada en la integración de la respuesta al estrés (Baubet *et al.*, 1994). Por esto los niveles de expresión de estos genes se midieron también luego de un tratamiento de estrés repetitivo usando el ensayo de protección a la RNAsa.

El paradigma de estrés utilizado fue el de inmovilización, para esto se inmovilizó a los animales introduciéndolos en un tubo de 2.5 cm de diámetro por 10 cm de longitud en el cual los ratones quedan forzosamente inmovilizados durante una hora. Este procedimiento se realizó dos veces por día (a las 10 y a las 19 hs) durante cinco días. Después del último

tratamiento los animales fueron sacrificados y se les extrajeron los tejidos a analizar. Como control se usaron ratones que fueron manipulados de la misma manera pero no fueron introducidos dentro de los tubos. Observamos que los niveles de expresión de POMC y POMC27* no fueron modificados significativamente luego de este paradigma, reflejando una respuesta diferente entre la rata y el ratón (figura 17). Tampoco podemos eliminar la posibilidad de contaminación del ARN hipotalámico con ARNm proveniente del lóbulo intermedio que imposibilitaría la correcta cuantificación de los mensajeros hipotalámicos, enmascarando el efecto.

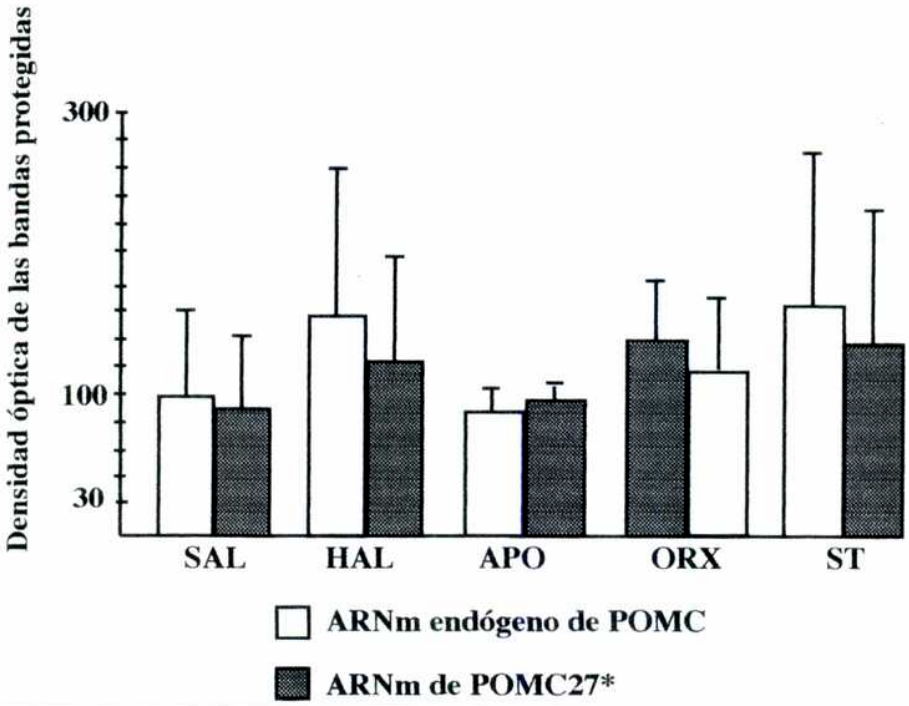


Figura 17. Ensayo de protección a RNAsa realizado sobre RNA obtenido de hipotálamos de ratones POMC27*
La cuantificación se realizó en al menos 5 experimentos diferentes. ORX: muestra obtenida de animales castrados. ST: muestra proveniente de animales sometidos a estrés.

3.6. *Análisis ontogénico de la expresión de POMC*

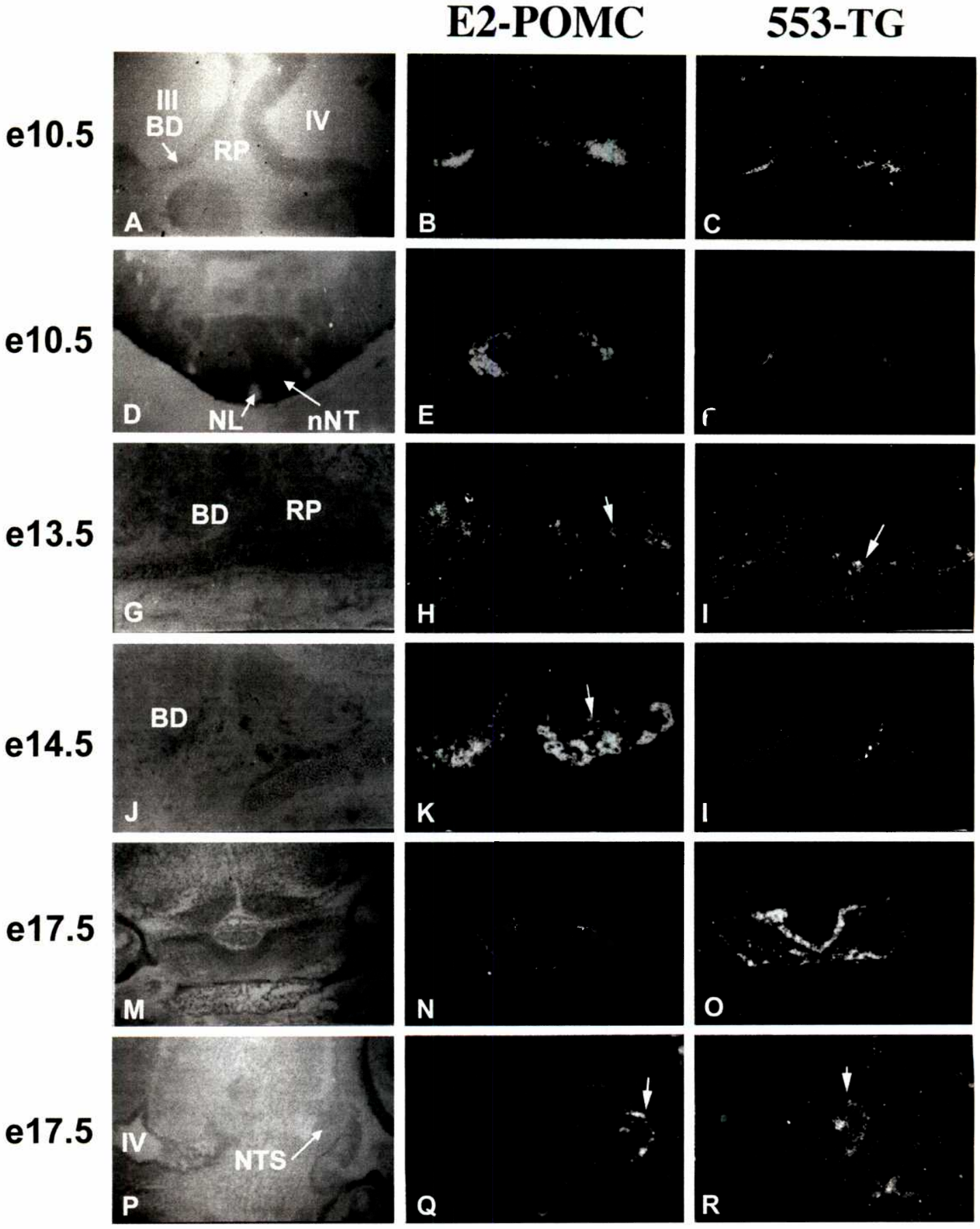
La expresión del gen de POMC durante el desarrollo sigue un programa bastante complejo. El ARNm de POMC en el embrión de ratón se observa por primera vez en el diencéfalo el día e10.5. En la hipófisis, la primera observación de ARNm de POMC se produce en los días e12.5 y e13.5 en el lóbulo anterior e intermedio, respectivamente (Japon *et al*, 1994). Con el fin de analizar si el transgén POMC27* conserva el mismo patrón temporal de expresión, fue diseñado un esquema de apareos que nos permitió aislar embriones desde el día e9.5 al día P1 para el seguimiento ontogénico. La hibridización *in situ* de cortes sagitales y coronales de estos embriones mostró que la expresión de POMC27* sigue un patrón temporal y espacial de expresión idéntico al del ARNm endógeno del gen de POMC (figura 18). La expresión más temprana de POMC27* fue observada en el día e10.5 en una región del diencéfalo basal, que posteriormente en el desarrollo dará origen al núcleo arcuato. Esta observación concuerda con estudios previos de la expresión del gen de POMC (Japón et al, 1994). También se detectó claramente el mensajero de POMC 27* en la base del cuarto ventrículo y en el neuro-epitelio del tubo neural, regiones que originarán el tallo encefálico y la columna vertebral, respectivamente. En el lóbulo anterior primitivo de la hipófisis la expresión de POMC27* fue observada en el día e13.5 y un día más tarde se evidenciaron células del lóbulo intermedio. En secciones coronales de hipófisis del día e17.5 se observó la expresión del transgén migrando de la región ventro-medial a la dorso-lateral, característico del reclutamiento de este tipo celular dentro del lóbulo anterior en desarrollo. En las secciones correspondientes al día e17.5, se puede observar una marcación bilateral con ambas sondas a la altura de la placa cerebelar, a ambos lados

del IV ventrículo, que correspondería al núcleo del tracto solitario en el embrión en desarrollo (figura 18).

Figura 18 (página 72). Análisis ontogénico de la expresión de POMC27* por hibridización *in situ*.
Microfotografías de campo obscuro de los mensajeros de POMC y POMC27* detectados por hibridización *in situ* usando sondas de oligonucleótidos marcadas con $[\alpha]^{35}S$ dATP en secciones de embriones aislados los días e10.5, e13.5, e14.5 y e17.5. La sonda 553-TG (columna derecha) detecta únicamente la expresión de POMC27*, mientras que la sonda E2-POMC (columna media) revela los mensajeros transgénico y endógeno de POMC simultáneamente. Las secciones fueron cortadas en plano sagital (A-L), coronal (M-O) u horizontal (P-R). Como referencia anatómica se muestran fotografías de campo claro de las secciones teñidas con rojo neutral en la columna de la izquierda. III: tercer ventrículo, IV: cuarto ventrículo, BD: diencéfalo basal, RP: bolsillo de Rathke (Rathke's pouch) , NL: lumen neural, nNT: neuroepitelio del tubo neural, NTS: núcleo de tracto solitario. Las flechas en H e I identifican células corticotróficas del lóbulo anterior, en K y L indican células melanotróficas del lóbulo intermedio. En Q y R las flechas señalan células del núcleo del tracto solitario. Magnificación: A-C y G-R: 100 X, D-F: 40 X.

Este resultado sugiere que POMC27* contiene toda la información necesaria para la regulación correcta de su expresión durante el desarrollo.

Contrariamente a lo observado en ratones adultos, durante el período embrionario no se observan diferencias en los niveles de expresión de los ARNm correspondientes al gen endógeno de POMC y al transgén POMC27* en el lóbulo anterior hipofisario. Esto podría ser explicado por una compensación de señales específicas del desarrollo a la ausencia de un *enhancer* basal de corticotrofos, o una estabilidad diferencial del ARNm transgénico en el estadio embrionario.


E2-POMC
553-TG
e10.5
III
BD
IV
RP
A
B
C
e10.5
D
NL
nNT
E
F
e13.5
BD
RP
G
H
I
e14.5
BD
J
K
I
e17.5
M
N
O
e17.5
IV
NTS
P
Q
R

3.7. *Análisis delecional de las secuencias flanqueantes de POMC27**

La comparación del patrón de expresión de POMC27* y de HAL* a nivel del sistema nervioso central indica la existencia de, al menos, un *enhancer* neuronal ubicado dentro de las secuencias flanqueantes presentes en POMC27* y ausentes en HAL *. Para identificar los elementos distales requeridos para la auténtica expresión neuronal de POMC se generaron deleciones de las secuencias agregadas a HAL* hacia el extremo 5´(P27*5'Δ) y de las agregadas al extremo 3´ (P27*3'Δ) utilizando enzimas de restricción según el esquema que se muestra en la figura 19.

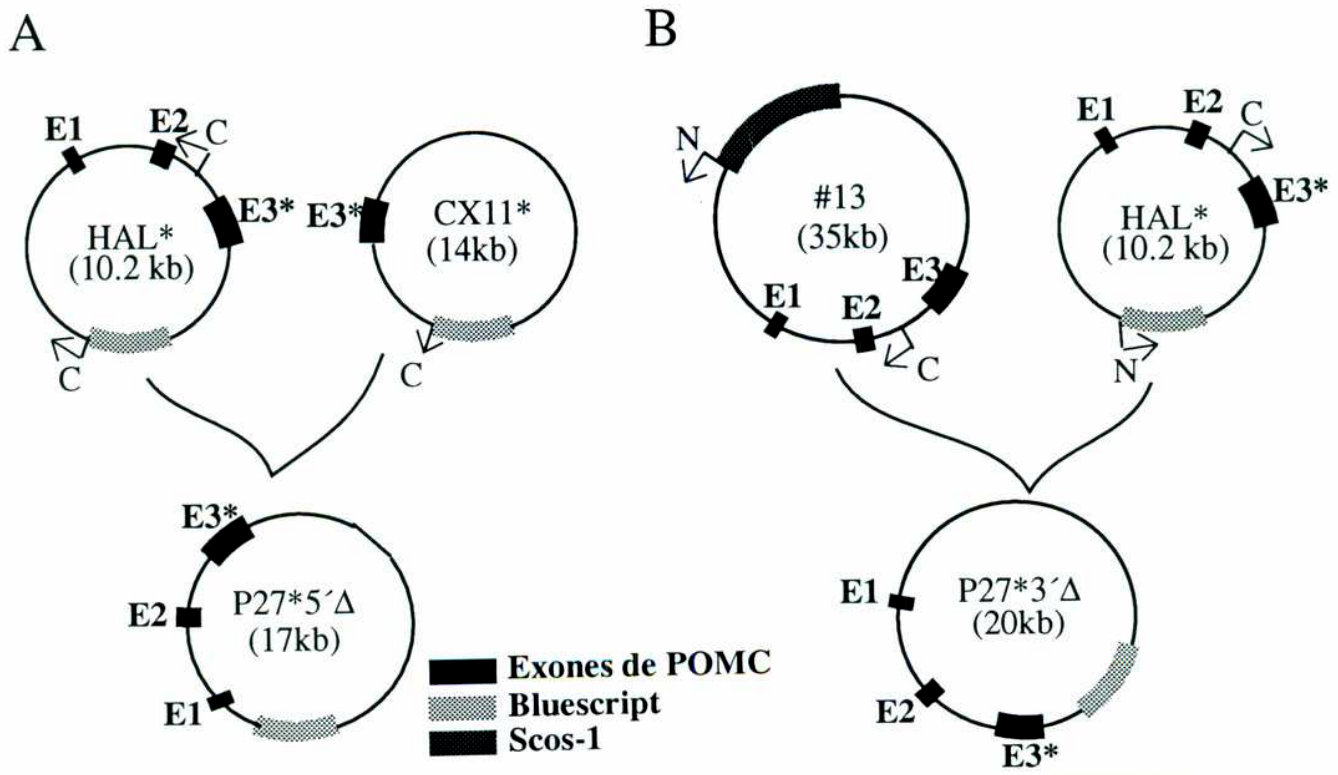


Figura 19. Esquema del subclonado utilizado para la construcción de los transgenes delecionales
A: Estrategia para generar P27*5'Δ. B: Construcción de P27*3'Δ

Se generaron ratones transgénicos para estas construcciones, y fueron identificados de la misma manera que los transgénicos para POMC27*. La expresión de los transgenes fue analizada por hibridación *in situ* en cortes de cerebro e hipófisis. La deleción de las secuencias 5' flanqueantes resultó en una falta total de expresión neuronal en el cerebro de los ratones transgénicos de las tres líneas independientes analizadas (figura 20), mientras que la expresión endocrina de este transgén resultó apropiada. (figura 20).

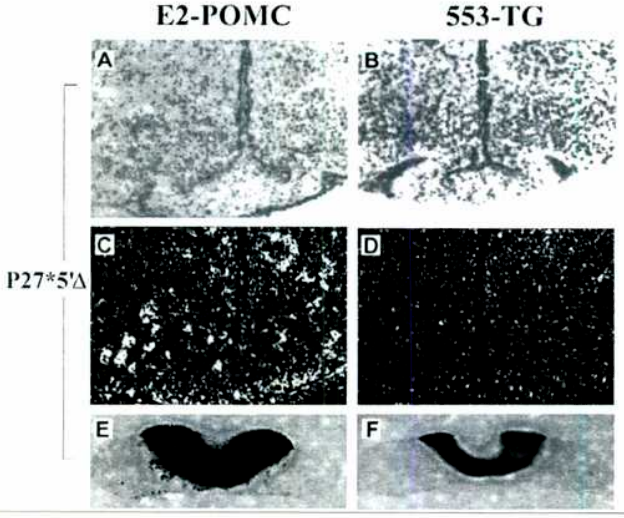


Figura 20. Análisis de la expresión de P27*5'Δ por hibridización *in situ*. Secciones coronales seriadas del hipotálamo medio basal (A-D) o de la hipófisis (E, F) fueron hibridizadas con la sonda E2-POMC (izquierda) o con la sonda 553-TG (derecha) marcadas con $[\alpha]^{35}S$. Las fotografías de campo claro muestran las secciones teñidas con rojo neutral (A, B, E, F).

Esto indica que el control de la expresión del gen de POMC es llevado a cabo por mecanismos independientes en cerebro y en hipófisis.

La hibridización *in situ* en cortes coronales de cerebro mostró una expresión correcta de pP27*3Δ en neuronas del núcleo arcuato en las dos líneas independientes analizadas (figura 21), indicando que el elemento que dirige la expresión del gen de POMC específicamente a neuronas estaría incluido en secuencias 5' flanqueantes del gen dentro de estas 11 kb distales.

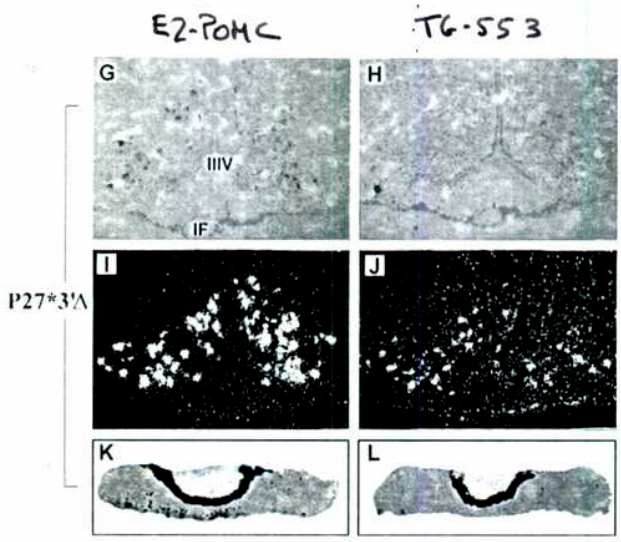


Figura 21. La expresión neurona-específica del gen de POMC está controlada por secuencias distales 5' flanqueantes. Estudio de la expresión de P27*3'Δ en ratones transgénicos por hibridización in situ en secciones coronales de cerebro(A-D) e hipófisis (E,F). Izquierda, secciones incubadas con la sonda E2-POMC. Derecha, secciones incubadas con la sonda 553-TG.

CONCLUSIÓN

Mostramos por primera vez la expresión de transgenes dirigida exclusivamente a neuronas de POMC en el SNC, bajo un control temporal y espacial preciso. La expresión de los transgenes conteniendo secuencias flanqueantes del gen de POMC fue detectada inequívocamente en neuronas productoras de POMC del núcleo arcuato del hipotálamo, así como en el diencéfalo en desarrollo, en el núcleo del tracto solitario y en la médula espinal. Los elementos de acción en *cis* necesarios para un direccionamiento eficiente están localizados dentro de 11 kb de sequencias flanqueantes localizadas río arriba del promotor de POMC. Este fragmento distal no fue requerido para la correcta expresión de transgenes en células de origen endócrino. Hay pocos ejemplos de direccionamiento neurona-específico de la expresión de transgenes al sistema nervioso central, que incluyen el gen de vasopresina (Ang et al, 1993), el gen de tirosina hidroxilasa (Min et al, 1994) y el gen de colina acetiltransferasa (Lonnerberg et al, 1995).

Todas las líneas independientes producidas con POMC27* o con P27*3'Δ mostraron expresión específica en el SNC, esta penetrancia del 100% sugiere que el fragmento genómico de POMC utilizado en ambos transgenes tiene suficiente independencia transcripcional como para aislar la expresión de influencias cromosómicas que podrían silenciar la expresión de los transgenes.

Los estudios ontogénicos realizados mostraron que el patrón temporal de expresión de POMC27* es idéntico al observado para el gen de POMC, y permitieron detectar expresión de POMC en el núcleo del tracto solitario, región del cerebro donde es muy dificil observar el mensajero de POMC en roedores adultos (Bronstein et al,

1992) y en la médula espinal, donde es detectado únicamente luego de su inducción por condiciones traumáticas particulares (Gutstein et al, 1992).

El direccionamiento preciso de transgenes a neuronas de POMC genera la posibilidad de explorar con más profundidad las funciones fisiológicas de estas neuronas y los mecanismos que regulan el destino de las células de POMC durante la organogénesis del hipotálamo. Por ejemplo, el direccionamiento de proteínas fluorescentes permitirá obtener registros fisiológicos de neuronas de POMC fácilmente identificables en cortes de hipotálamo. Las neuronas de POMC del núcleo arcuato son un sustrato ideal para estudiar la fisiología involucrada en el control de la alimentación, y particularmente para caracterizar la interrelación entre la leptina y las melanocortinas derivadas de POMC, un tema actualmente muy discutido (Seeley et al, 1997; Boston et al, 1997). La oncogénesis dirigida a este tipo celular en ratones transgénicos (Alarid et al, 1996) podría servir para producir una línea celular neuronal con fenotipo endorfinérgico que serviría para estudiar las propiedades de esta población neuronal *in vitro*, una herramienta muy útil para estudios transcripcionales.

Parte 2: Caracterización neuroendócrina y central de ratones deficientes en β–endorfina, producto de una mutación puntual en el gen de POMC

Una gran variedad de funciones han sido atribuidas al péptido opioide β–endorfina a través de la utilización de antagonistas y agonistas de escasa selectividad sobre los subtipos de receptores a opioides, de la inducción de la liberación de péptidos opioides endógenos mediada por estrés o por estimulación eléctrica, o de inyecciones *in vivo* de este péptido. Con el objetivo de estudiar en forma más precisa la contribución de β–endorfina en respuestas opioides, utilizamos como modelo de estudio ratones mutantes incapaces de sintetizar β–endorfina. Estos ratones fueron generados a partir de la introducción de una mutación puntual en el gen de POMC mediante recombinación homóloga en células embrionarias totipotentes de ratón (Rubinstein et al ,1994). Animales portadores de esta mutación en ambos alelos del gen de POMC (β–end -/-) producen una prohormona truncada capaz de ser procesada a ACTH, α, β y γ-MSH en total ausencia de β–endorfina (figura 22, Rubinstein *et al*,1996). Estos ratones β–end -/- nacen, y se reproducen normalmente.

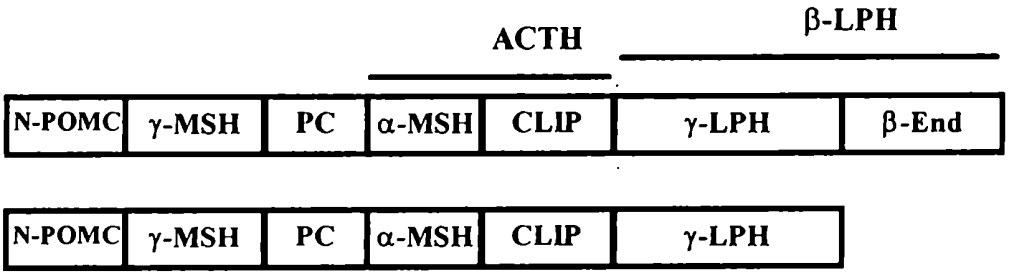


Figura 22.Estructura de las prohormonas

1. *Identificación del genotipo*

La genotipificación de los ratones se realizó por análisis de PCR de muestras de ADN genómico obtenido de la porción terminal de la cola. Las reacciones se realizaron en presencia de tres *primers,* dos de los cuales aparean con la región 5'y el otro con la 3' de la mutación (*primers* 5'-889, 5'-186 y 3'-187 de la figura 22). El *primer* 5'-186 es capaz de hibridar sólo con secuencias presentes en el alelo mutado, mientras que el 5'-889 y el 3'-187 hibridan con regiones de POMC. La discriminación de los alelos amplificados se realizó por los tamaños de los fragmentos generados, la amplificación del alelo de POMC normal da como resultado una banda de 1,2 kb y la del alelo mutado da una banda de 1,4 kb. La amplificación de ambas bandas indica heterocigocis. En la figura 23 se puede observar una genotipificación de estos alelos por PCR.

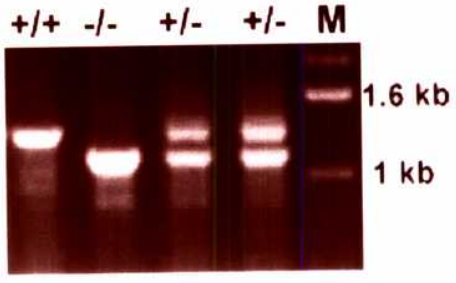


Figura 23. Identificación de ratones β–end -/- por PCR.

2. *Fenotipo de los ratones deficientes en β–endorfina*

2.1. *Mayor peso corporal*

Los ratones homocigotas para la mutación (deficientes en β-endorfina) tienen un peso normal al nacer, pero observamos que luego de entrar en la pubertad adquieren un peso corporal mayor que el de sus hermanos normales. Para confirmar y cuantificar esta observación se pesaron ratones β–end-/-, heterocigotas y normales una vez por semana durante 12 semanas. A partir de estos datos se realizaron curvas de crecimiento comparativas entre los dos genotipos y se confirmó que los ratones mutantes pesan entre un 15 y un 20% más que los ratones normales y que los heterocigotas (figura 24). Este fenotipo es más evidente en machos que en hembras.

Para identificar el origen de esta diferencia se extrajeron y pesaron individualmente los depósitos grasos y los órganos de ratones adultos. No se observaron diferencias en el peso de órganos tales como el hígado, riñón, bazo, y testículos, ni en los depósitos de grasa parda interescapular. Sin embargo se observó un contenido de grasa blanca significativamente mayor en los animales homocigotas para la mutación (Figura 25). El aumento en la cantidad de grasa blanca fue observada tanto en los depósitos grasos inguinales (144 ± 30 %) como en los perirrenales (133 ± 23 %).

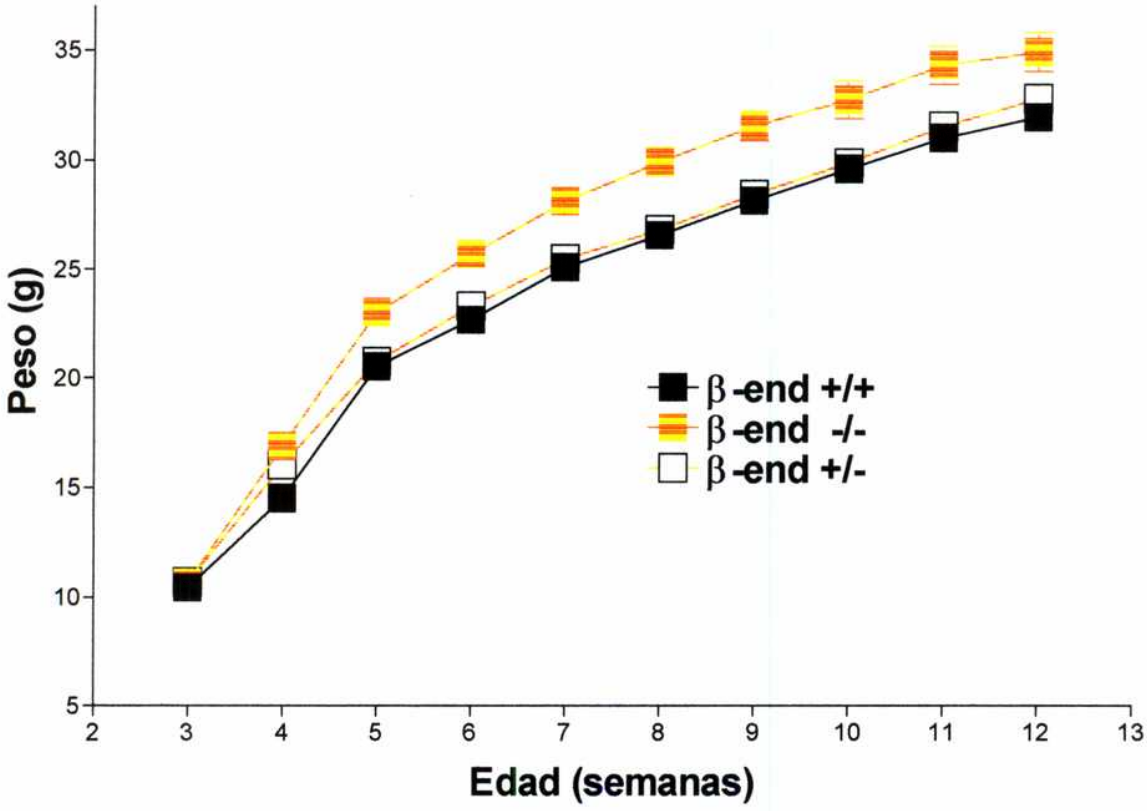


Figura 24. Efecto de la deficiencia en β–endorfina sobre el peso corporal. Curvas de peso de ratones macho normales (β-end +/+, cuadrados negros), heterocigotas (β-end +/-, cuadrados vacíos) y homocigotas mutantes (β-end -/-, cuadrados rojos). Los puntos representan el promedio ± el error estándar de al menos 36 ratones por genotipo.

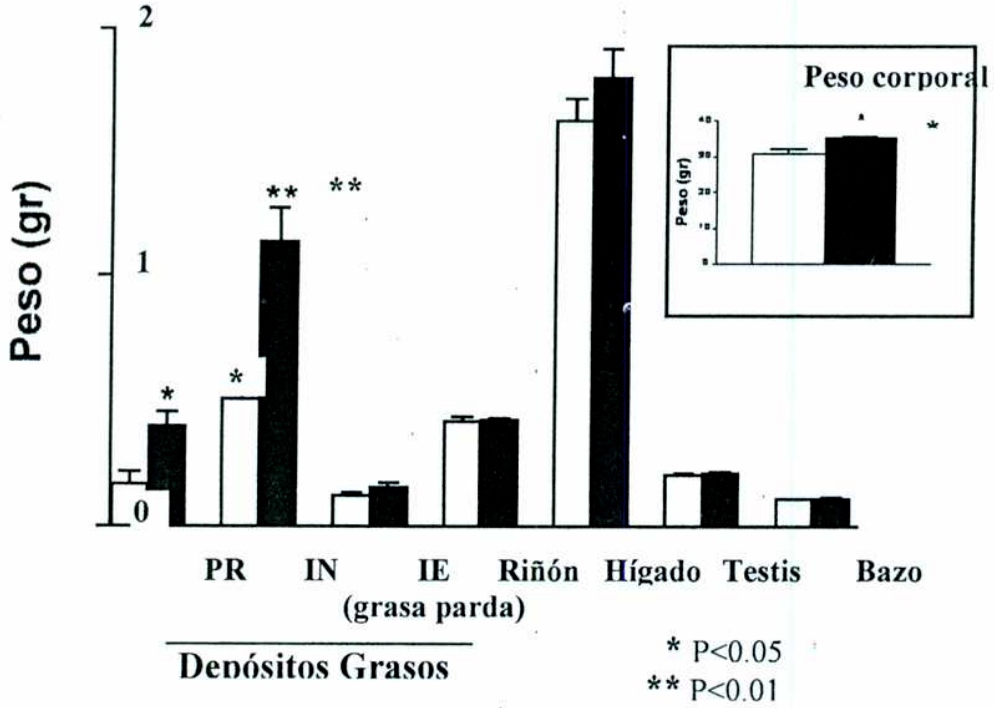


Figura 25. Los ratones β–end -/- tienen mayor acumulación de grasa blanca. Se pesaron los órganos y depósitos grasos de ratones normales y mutantes. Se reporta el promedio ± el error estándar (n=18). PR: Perirrenal, IN: Inguinal, IE: Interescapular.

Numerosos experimentos indican que la leptina, proteína secretada por los adipocitos, juega un papel muy importante en la regulación del contenido graso corporal (Campfield et al, 1995; Halaas et al ,1995; Pelleymonter et al ,1995). La leptina actuaría a través de receptores en el hipotálamo donde se inician acciones tendientes a limitar el consumo de alimentos , aumentar la producción de calor (termogénesis) y alterar la secreción y acción de algunas hormonas (especialmente insulina). Se vio que los niveles plasmáticos de esta

proteína se correlacionan fuertemente con la adiposidad total (índice de masa corporal) y que un incremento en el contenido graso produce un aumento en los niveles de leptina.

Para cuantificar los niveles de leptina en suero de ratones β–end-/- y de ratones normales, se realizó un radioinmunoensayo utilizando un anticuerpo comercial sintetizado contra leptina de ratón purificada. Los ratones mutantes mostraron elevados niveles de leptina en suero comparado con los controles, probablemente debido a su mayor contenido graso, pero la disminución normal de estos niveles en condiciones de ayuno (16 hs.) también se observó en los mutantes, indicando que los mecanismos que regulan dichos niveles no están eliminados (figura 26).

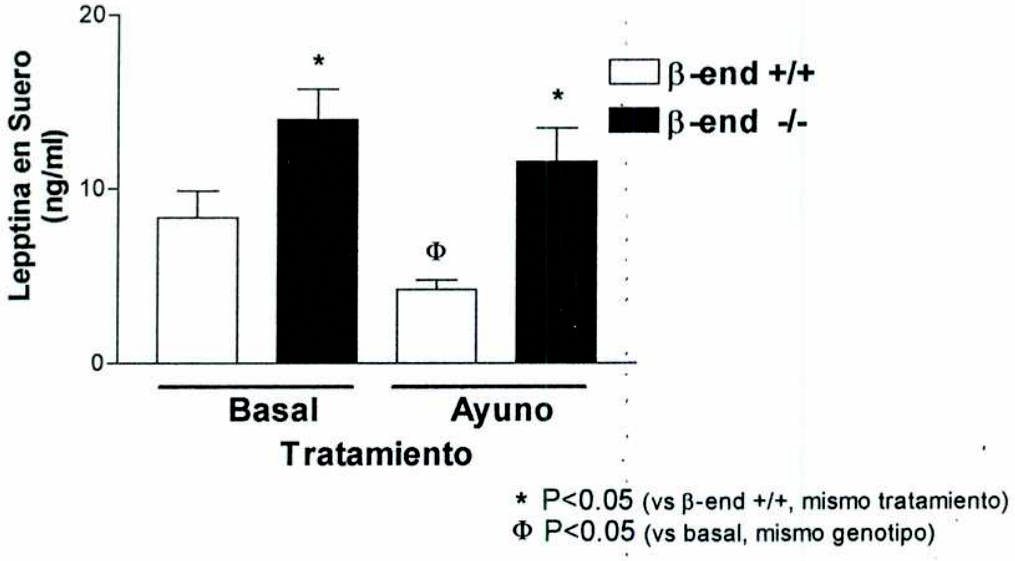


Figura 26. RIA para la medición de niveles de leptina en suero de ratones normales y mutantes.

La insulina es la principal responable de la captación, utilización y almacenamiento de los nutrientes celulares. Sus efectos anabólicos incluyen la estimulación de la utilización

y el almacenamiento intracelular de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, mientras que inhibe procesos catabólicos como la metabolización del glucógeno, proteínas y grasas. Basandonos en que numerosos síndromes de obesidad, particularmente aquellos que involucran señalización via receptores centrales de melanocortinas, presentan hiperinsulinemia (Lu et al, 1994; Yen et al., 1994; Huszar et al, 1997), se midieron los niveles de insulina en los dos genotipos. Los ratones β–end -/- tienen niveles elevados de insulina en suero (6,0± 0,5 vs. 2,7± 0,4), pero la respuesta al ayuno también es normal en este caso (figura 27).

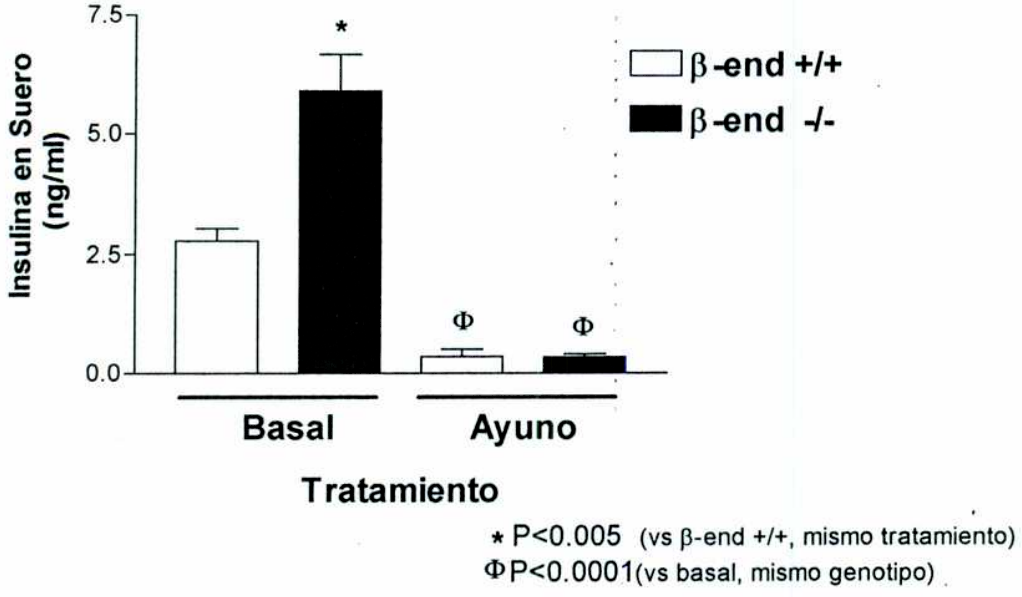


Figura 27. Cuantificación de los niveles de insulina en suero de ratones β–end -/- y normales.

Esos resultados indican que el aumento de peso se produce a expensas de un mayor contenido de grasa blanca y niveles elevados de leptina e insulina en suero. Esto podría deberse a una mayor ingesta de alimento, a una menor actividad física o a trastornos

metabólicos. Para diferenciar entre estas posibilidades realizamos los siguientes experimentos.

Se cuantificó el alimento pulverizado ingerido por estos ratones durante 48 hs en condiciones normales, y durante 24 hs. luego de un período de 16 hs de ayuno. No se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos en la ingesta de alimento. Tampoco se observaron diferencias en cuanto al patrón de alimentación, inferido por la cantidad y duración de eventos individuales de alimentación, ni en cuanto a la ingesta de agua.

Para medir la predisposición al ejercicio físico se midió la actividad desarrollada por ratones de ambos genotipos en una rueda giratoria. Los ratones mutantes se comportaron de la misma manera que los normales frente a este estímulo locomotor, mostrando bastante interés inicialmente y perdiéndolo gradualmente. No hubo diferencias en el patrón de utilización de la rueda, la mayor actividad fue desarrollada por la noche.

Estos datos sugieren que el aumento de peso corporal no es resultado de una mayor ingesta de comida ni una menor actividad física, sino de una alteración metabólica.

2.1.1 *Comportamiento materno*

Dado que la diferencia en el peso corporal entre los dos genotipos se hizo evidente recién cuando los ratones alcanzaron la pubertad, se presumió que este fenotipo debería ser independiente de cualquier efecto materno. Para confirmar esto se realizaron cruzamientos recíprocos de crías neonatas de forma tal que ratones mutantes fueran criados por madres normales y viceversa. El tamaño y la composición sexual de las camadas transferidas fue similar para ambos genotipos. Sorprendentemente, los ratones

normales criados por madres mutantes alcanzaron luego de la pubertad un peso cercano al de los ratones sin β–endorfina criados por sus propias madres; y los ratones mutantes criados por madres normales alcanzaron un menor peso corporal que sus hermanos criados por su propia madre β–end -/- (figura 28).

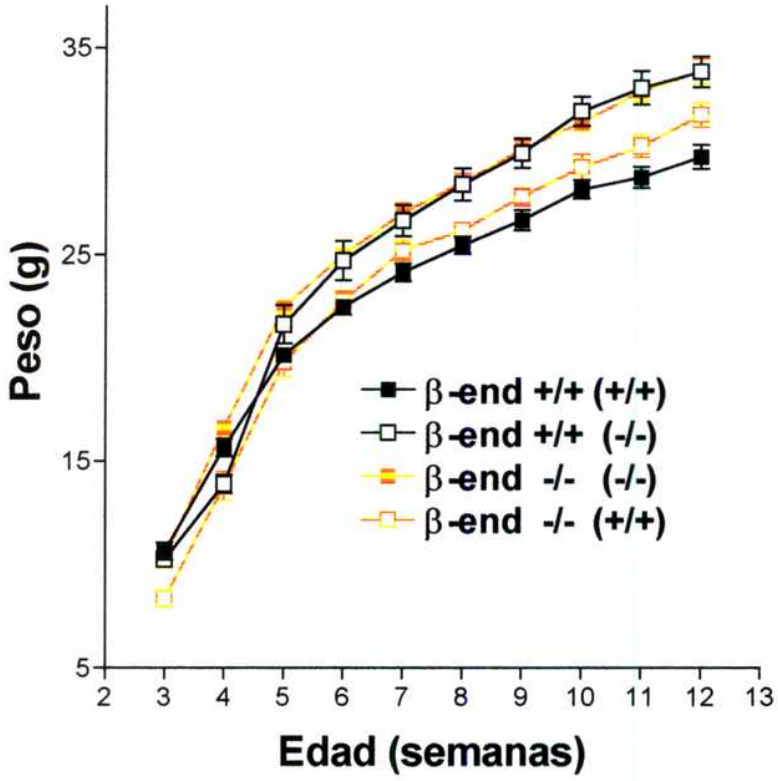


Figura 28. El comportamiento de las madres tiene un efecto a largo plazo sobre las crías. Curvas de crecimiento de machos mutantes (cuadrados negros) y normales (cuadrados rojos) criados por sus propias madres (cuadrados llenos), o por madres del otro genotipo (cuadrados vacíos). Se graficaron los datos ± el error estándard.

Este resultado demuestra que la diferencia del peso que alcanzan los dos fenotipos se debe, al menos en parte, a un efecto materno. Experimentos realizados hace más de 40 años en ratas (Levine et al, 1957) mostraron que una estimulación sutil realizada en las

adulta de los animales. Ratas estimuladas más tardiamente no manifestaban los mismos cambios. Este fenómeno de *imprinting* se investigó con más detalle recientemente, y se determinó que el manipuleo de las crías en realidad modificaba la conducta de la madre hacia las crías (Liu et al, 1997) y este cambio en la conducta materna producía modificaciones neurohumorales y conductuales irreversibles de largo plazo en las crías.

Para estudiar si el aumento del peso corporal a partir de la pubertad de los ratones criados por hembras β-end -/- era debido a un diferente comportamiento materno, se examinó la habilidad de 6 madres de los dos genotipos para recuperar crías desperdigadas en la jaula y volver a formar el nido. Para esto se puso una cría en cada esquina de la jaula, menos en la esquina más cercana a la posición de la única hembra y del macho. Se midió el tiempo de reconstrucción del nido como índice de comportamiento maternal. No se observaron diferencias en el tiempo de recuperación (20 ± 8 vs 23 ± 10 s para las normales y β–end -/- respectivamente), ni en la cantidad de crías recuperadas (2.7 ± 0.25 vs 2.5 ± 0.3). No hubo tampoco diferencias en el comportamiento, las hembras de los dos genotipos juntaron a las crías una por una levantandolas con la boca y luego se acostaron sobre ellas para permitir el amamantamiento durante todo el resto del tiempo de observación (10 min.). El comportamiento de los machos también fue similar en ambos genotipos, los machos normales recuperaron 1,61 ± 0,21 crías mientras que los mutantes recuperaron 1,68 ± 0,24 crías.

2.1.2. *Lactancia*

Estos resultados nos llevaron a pensar en diferencias en producción, cantidad o calidad lechera entre las hembras de ambos genotipos. Para investigar esto, crías lactantes de 7 u

11 días de edad fueron separadas de sus madres. Luego de 3 horas de separación fueron pesadas individualmente y 4 de éstas (aproximadamente la mitad de la camada) fueron devueltas a la jaula. Luego de 15 min de ser amamantadas por sus madres fueron retiradas nuevamente y vueltas a pesar. Se determinó la diferencia de peso alcanzada por las crías en los15 min de amamantamiento luego de pasar 3 horas privadas de alimento. Esta diferencia de peso se considera como la cantidad de leche ingerida por las crías durante esos 15 min. Las crías que nunca fueron reintegradas a sus madres también fueron pesadas como control. Los ratones mutantes de 11 días aumentaron 0,16 ± 0,03 g, mientras que los normales de su misma edad aumentaron 0,06 ± 0,03 g (figura 29).

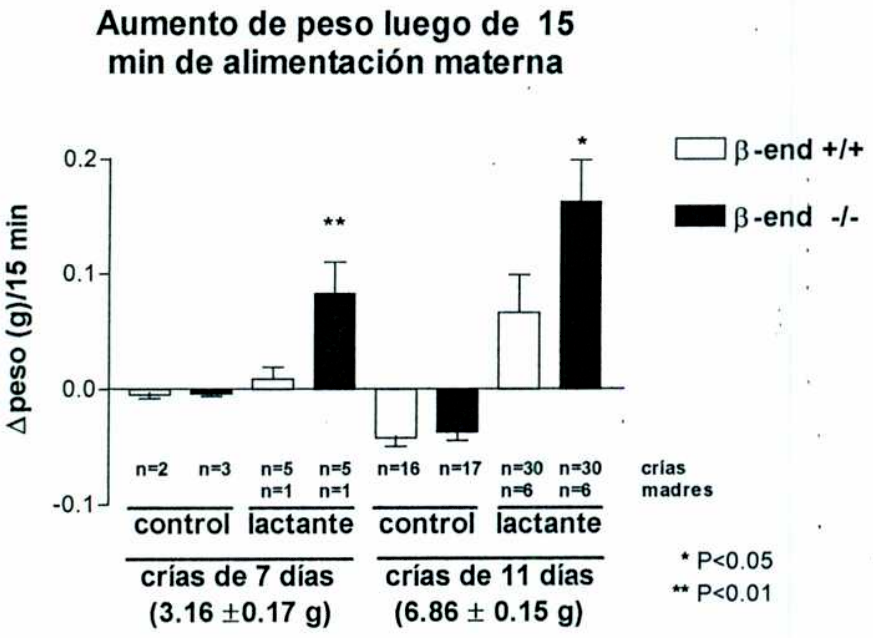


Figura 29.

Esta diferencia en el peso adquirido durante 15 min. de re-amamantamiento, que refleja una diferencia en la cantidad de leche ingerida por las crías, podría deberse a que la capacidad de succión de los mutantes es mayor que la de los normales. Sin embargo, en los ensayos de cruzamientos recíprocos las crías normales amamantadas por madres mutantes adquirieron un peso corporal mayor que el control, y lo contrario pasa cuando los ratones β–end -/- fueron criados por madres normales; esto indica que la capacidad succionadora no está modificada en estos mutantes. Alternativamente, las madres mutantes podrían tener una mayor liberación de leche que las madres normales, al menos durante los primeros minutos de succión. Se sabe que la succión de los pezones activa un circuito de retroalimentación positiva que produce la liberación de oxitocina acumulada en las neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN) al torrente sanguíneo. Esta oxitocina actúa sobre la glándula mamaria aumentando la constricción de los canales mamarios promoviendo la secreción de leche.

2.1.3. *Oxitocina*

Las madres que participaron del experimento anterior fueron sacrificadas por decapitación, se les extrajo sangre, cerebro e hipófisis.

Se estudiaron los niveles de expresión de oxitocina en el PVN de hembras normales y mutantes, por hibridización *in situ* de mRNA utilizando como sonda un oligonucleótido complementario al mRNA de oxitocina de ratón (5'-CTCCGAGAAGGCAGACTCAGG GTCGCAGGC-3') en cortes coronales del hipotálamo a la altura del PVN. La expresión de oxitocina durante el parto y en hembras vírgenes fue similar para los dos genotipos. Sin embargo, luego de 3 hs de separación de sus crías seguidas por 15 min. de

amamantamiento, los niveles de expresión de oxitocina en el PVN fueron significativamente mayores en las madres β–end -/- (figura 30).

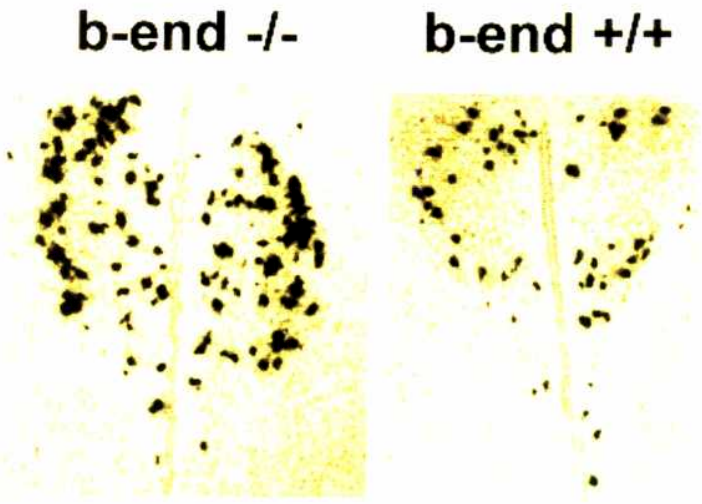


Figura 30.

Estos resultados sugieren que uno de los factores involucrados en el control de las neuronas oxitocinérgicas es la β–endorfina y que este neuropéptido actuaría en el proceso de reactivación inducida por succión en estas neuronas. Ha sido reportado que opioides endógenos inhiben la liberación de oxitocina a nivel del hipotálamo y del lóbulo neural (34-78, 76-78 del neuroendo 1996;63), pero en la liberación inducida por succión esta inhibición parece ocurrir sólo en ciertas condiciones (Summy-Long et al, 1990). Los péptidos opioides han sido involucrados también en la inhibición inducida por estrés del reflejo de liberación de leche (Negoro HN et al, 1987).

CONCLUSIÓN: Los resultados obtenidos utilizando ratones mutantes incapaces de producir β–endorfina indican que esta proteína juega un papel importante en la regulación negativa de la expresión de oxitocina, por lo menos luego de una situación de estrés como es la separación de sus crías por un período de 3 horas. Esta conclusión es apoyada por experimentos que demostraron que el bloqueo de receptores opioides con el antagonista naloxona no altera la liberación de oxitocina en ratas normalmente hidratadas, pero que aumenta esta liberación en ratas deshidratadas (Grell et al, 1988; Hartman et al, 1987). Por lo tanto la β–endorfina parecería mediar la inhibición de la liberación de oxitocina en respuesta al estrés y ,a su vez la transcripción del gen, tal como lo demuestra nuestro experimento. La modificación del patrón de liberación de oxitocina en ratones deficientes en β-endorfina determinaría la diferencia observada en el peso corporal alcanzado por los ratones amamantados por hembras mutantes. Los animales de bioterio no están sometidos a los mismos estresores que los animales salvajes, sin embargo soportan diversas situaciones de estrés (cambio de jaulas, presencia de humanos, ruidos extraños, etc). La interrupción de la lactancia por estrés es un fenómeno ampliamente comprobado en roedores (Almeida et al, 1994) y en humanos (Ueda et al, 1994), y la acción inhibitoria de CRH sobre la liberación de oxitocina se consideró como responsable de este efecto (Almeida et al, 1994). Nuestros resultados indican que la β-endorfina podría estar mediando el efecto de CRH sobre la liberación de oxitocina. La alteración del patrón de amamantamiento en los ratones β-end -/- tendría un efecto fisiológico a largo plazo, que derivaría en un aumento del peso

corporal. Un efecto de este tipo ha sido demostrado en ratas con estimulación infantil (Liu et al, 1997).

2.2. *β-endorfina y etanol*

Evidencias experimentales indican que el etanol altera la liberación de β–endorfina en el hipotálamo e hipófisis *in vitro* (Gianoulakis 1990, de Waele et al 1992, Keith et al 1986), e *in vivo* (Gianoulakis y Barcomb, 1987, Thiagarajan et al 1989). Algunas respuestas neurofarmacológicas al etanol y los opioides son similares, por esto se ha sugerido que alguno de los efectos del etanol podrían estar mediados a través del sistema opioide endógeno (Kalant, 1977). En 1992 de Waele demostró que la cepa C57BL/6, que tiene preferencia por el alcohol, tiene una mayor liberación de β–endorfina hipotalámica estimulada por el etanol que la cepa DBA/2, que evita el consumo de alcohol. Esto sugirió que diferencias en la respuesta del sistema hipotalámico β–endorfinérgico determinadas genéticamente, podían ser las responsables de las diferencias observadas en el consumo voluntario de alcohol entre estas dos cepas.

2.2.1. *Locomoción*

Uno de los efectos medibles del etanol es la inducción de la actividad locomotora, utilizada como modelo animal de euforia inducida por etanol en humanos (Phillips and Shen 1996). Este efecto requiere el aumento de la liberación dopaminérgica en el núcleo acumbens, proceso crucial para la sensación de recompensa (Koob, 1992). Algunos autores proponen que los péptidos opioides liberados el alcohol inducen la liberación

dopaminérgica en los ganglios de la base (Di Chiara et al, 1996). Si esta hipótesis fuera correcta, los ratones deficientes en β-endorfina podrían exhibir diferencias en sus respuestas motoras inducidas por el alcohol. Con el objetivo de analizar esta posibilidad determinamos la actividad locomotora horizontal en ratones luego de recibir solución fisiológica o distintas dosis de etanol. Debido a que la β-endorfina se libera en situaciones de novedad, realizamos un paradigma experimental que permitió a los animales conocer el recinto en donde se hicieron las mediciones por dos días consecutivos. Al tercer día los ratones recibieron el tratamiento correspondiente. La actividad locomotora se cuantificó en los ratones de ambos genotipos diariamente los tres días, inmediatamente después de recibir una inyección de solución fisiológica (días 1 y 2), o una inyección de 2 g/kg de etanol (día 3). Los animales fueron monitoreados continuamente por 20 min. luego de la inyección y se registraron datos cada 5 min. Para corregir las diferencias dependientes del genotipo en la locomoción basal, se sustrajo la actividad locomotora registrada (cuentas) del día 2, a las cuentas correspondientes al día 3 del ensayo. Este método de substracción fue utilizado anteriormente con éxito (Phillips et al 1991).

La administración de etanol produjo sobre la actividad locomotora efectos diferentes en los dos genotipos. Los resultados indicarían que dosis que no tuvieron efecto sobre la actividad locomotora en ratones normales resultaron hiperlocomotoras en ratones mutantes, sin embargo la observación de los movimientos realizados por los ratones mutantes fueron completamente diferentes que los que realizan los ratones normales que recibieron dosis efectinvas en la inducción de la actividad locomotora. La actividad desarrollada por los mutantes luego de haber recibido una dosis de 2 g/kg de etanol nos dió la impresión de ser totalmente involuntaria y falta de control.

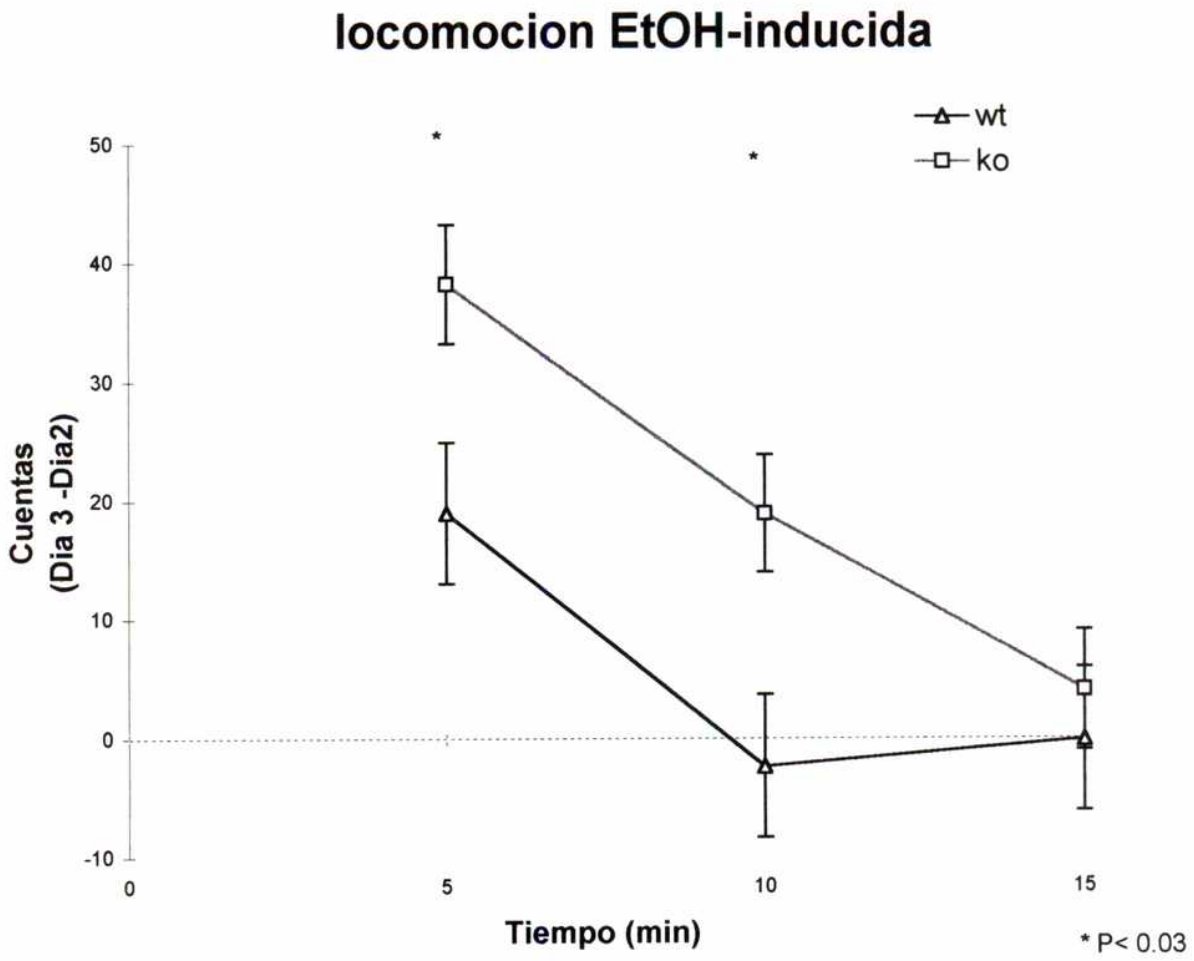


Figura 32.

2.2.1.1. *Ataxia inducida por etanol*

En los experimentos de locomoción arriba comentados observamos que los ratones mutantes inyectados con etanol parecían tener deficiencias en cuanto a la capacidad de coordinar los movimientos. Con la intención de cuantificar y confirmar esta observación se utilizó el ensayo del cilindro giratorio (rotarod), que es un test ampliamente utilizado para medir la habilidad de los roedores de realizar movimientos complejos coordinados durante un tiempo. Animales de los dos genotipos fueron entrenados en la tarea un sola vez durante 9 min., tiempo durante el cual se volvió a colocar en el cilindro a los ratones después de cada caída. Dos horas después fueron ensayados durante 3 min. luego de recibir inyecciones de etanol (0,14; 0,7; 1,4; 1,7 y 2 g/kg) o salina. Se registró el número

de caídas, el tiempo de permanecía sobre el cilindro entre caídas y la totalidad del tiempo que estuvieron sobre el rotarod en los 3 min. Aquellos ratones que no lograron mantenerse en el cilindro durante la sesión de entrenamiento por al menos 1 minuto sin caerse fueron descartados. Inesperadamente, fue significativamente mayor la proporción de ratones β–end -/- (45 % vs 12% de ratones control) que fueron eliminados del ensayo por no haber "aprendido" a mantenerse sobre el rotarod por el tiempo mínimo establecido (1 min.). Inclusive, entre los ratones que sí alcanzaron el minuto de permanencia sobre el cilindro, el tiempo requerido para esto fue significativamente mayor en los ratones mutantes (figura 33).

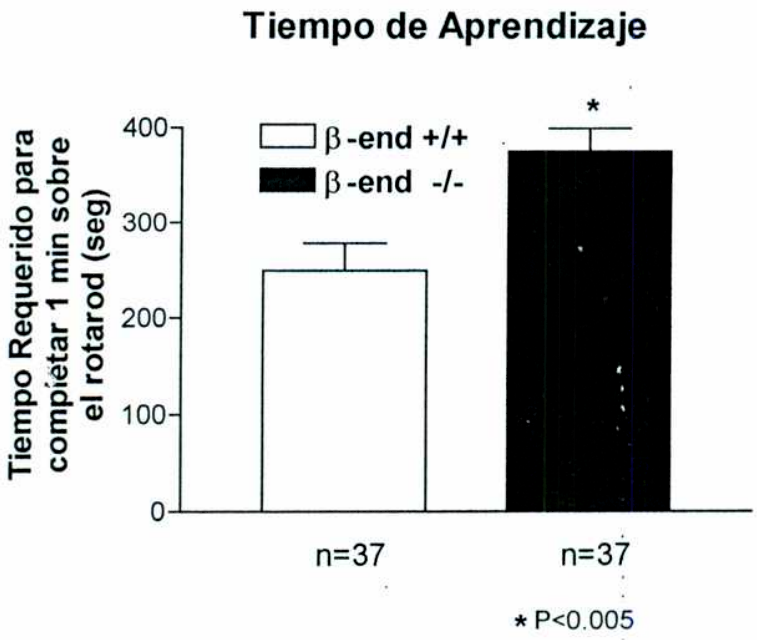


Figura 33.

Esta observación de una capacidad motora diferencial, junto con la observación de una alteración en la locomoción del primer día del ensayo de locomoción en los ratones deficientes en β–endorfina podría estar involucrando a esta proteína en respuestas no identificadas a situaciones de estrés, tales como la presentación de un ambiente desconocido o a la imposición de una tarea nueva. También podrían ser fenotipos independientes. Pese a estas diferencias, este ensayo del cilindro rotante fue utilizado para medir ataxia dado que, una vez que los ratones aprendieron a mantenerse sobre el rotarod, el desempeño de unos y otros durante el test fue similar luego de la inyección de salina (figura 34) o sin haber sido inyectados.

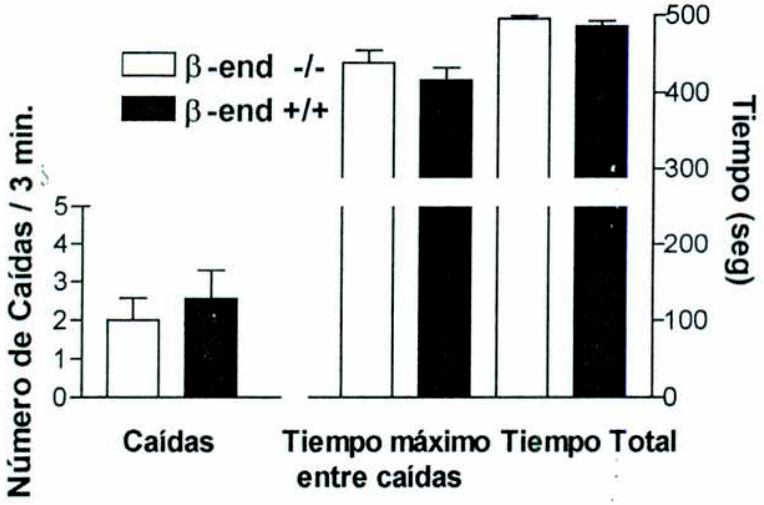
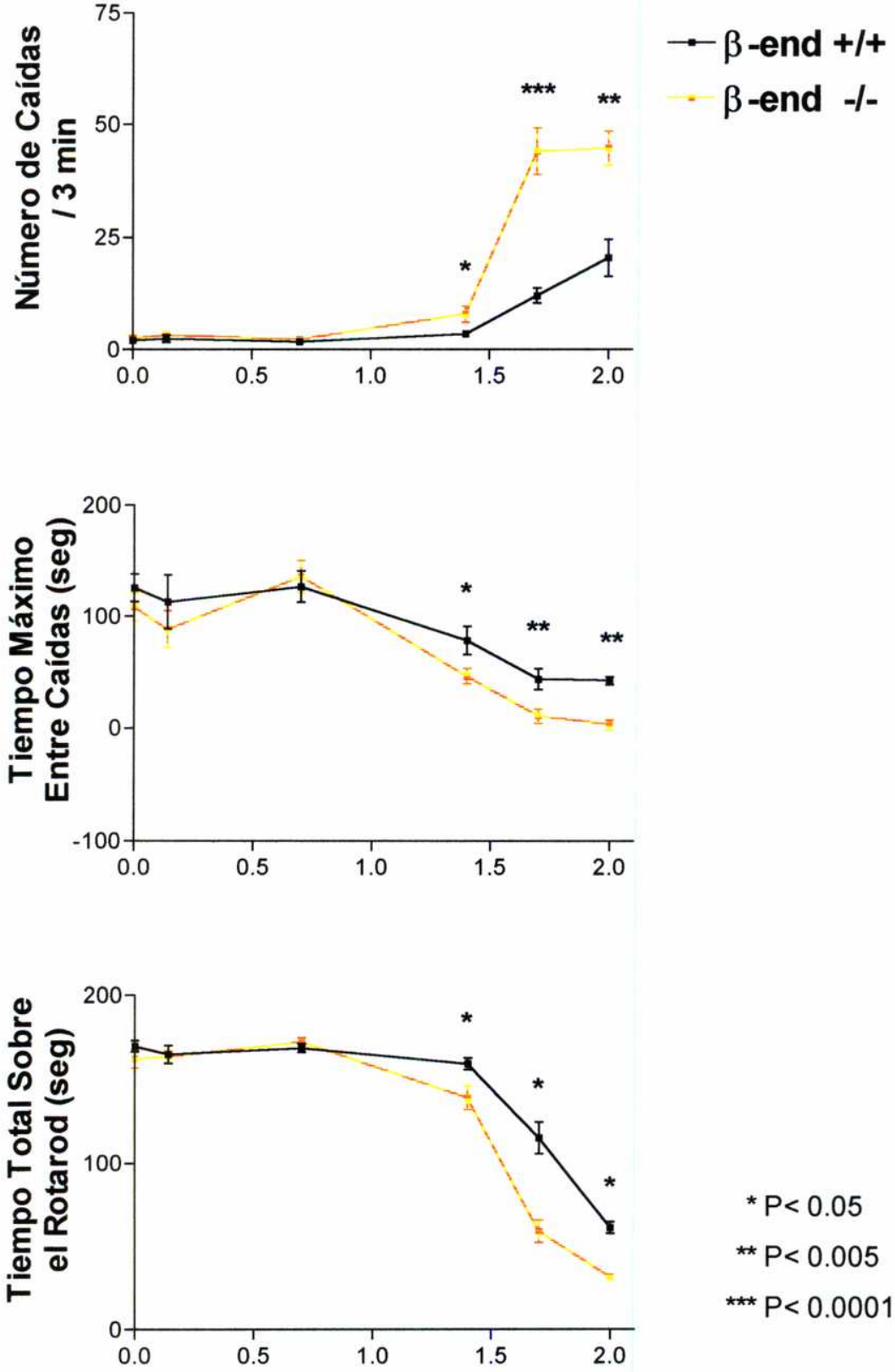


Figura 34.

Confirmando nuestras observaciones previas, la ataxia inducida por el alcohol fue significativamente más profunda en los ratones β–end -/- que en los ratones normales,

apoyando la observación que la ausencia de β–endorfina produce supersensibilidad al etanol, al menos en sus efectos negativos sobre el control de los movimientos (figura 35).


Número de Caídas / 3 min
75
50
25
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
*
***
**
β-end +/+
β-end -/-
Tiempo Máximo Entre Caídas (seg)
200
100
0
-100
*
**
**
Tiempo Total Sobre el Rotarod (seg)
200
100
0
*
*
*
* P< 0.05
** P< 0.005
*** P< 0.0001

Para cuantificar la ataxia por otro método se colocó a estos ratones sobre una parrilla plástica con barrotes de 0,4 cm de diámetro separados cada 1,5 cm, a una distancia de 1,5 cm sobre el nivel del piso, inmediatamente después de inyecciones de alcohol o salina. Se cuantificó el número de veces que los animales fallaron en apoyar sus patas en los barrotes y tomaron contacto con el piso (error/metida de pata) y simultáneamente se cuantificó la actividad locomotora. La relación entre la cantidad de metidas de pata y la actividad locomotora se utilizó para comparar la respuesta atáxica de ratones deficientes en β–endorfina y de ratones normales. De acuerdo con los experimentos anteriores, los ratones mutantes tuvieron mayor dificultad para coordinar sus movimientos, demostrado por el hecho de haber cometido más errores que los ratones normales luego de recibir etanol en dosis que superaran los 1,4 g/kg de peso corporal (figura 36).

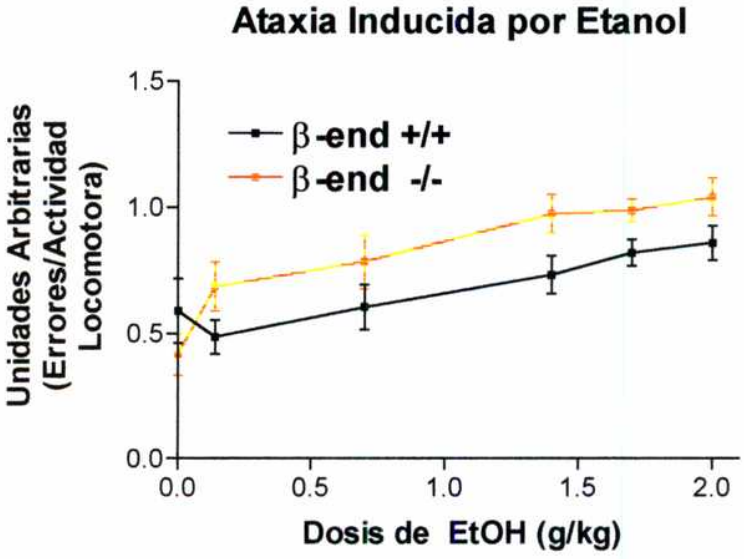


Figura 36.

Esta participación podría estar involucrando a la β–endorfina directa o indirectamente o a los receptores opioides que estarían alterados en estos ratones mutantes en su número, composición o en su interacción con otros factores, debido a la ausencia de uno de sus ligandos más importantes. Podría ser también que los niveles de otros opioides estén aumentados en estos ratones lo suficiente como para que una mínima descarga de alguno de ellos inducida por el alcohol, produzca esta aparente supersensibilidad al alcohol.

BIBLIOGRAFÍA

Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, Mellon, PL (1996) Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. Development 122:3319-3329

Almeida OF, Yassouridis A, Forgas Moya (1994) Neuroendocrinology 59:72-77

Ang HL, Carter DA, Murphy, D (1993) Neuron-specific expression and physiological regulation of bovine vasopressin transgenes in mice. EMBO J 12:2397-2409

Autelitano DJ, Lundblad JR, Blum M, Roberts, JL (1989). Annu. Rev. Physiol 51:715-26

Baubet V, Fevre-Montange M, Gay N, Debilly G, Bobillier P, Cespuglio R (1994) Effects of an acute immobilization stress upon proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels in the mediobasal hypothalamus: a quantitative in situ hybridization study. Brain Res Mol Brain Res 26:163-168

Bhanot r y Wilkinson M (1983) Endocrinology 112:399-401

Bijslma WA, Schotman P, Gispen WH (1983) Muscle Nerve 6:104-112

Bishop JF, Mouradian M (1993) Mol Cell Endocrinology 97:165-171

Bishop JF, Rinaudo M, Ritter JK, Conant K, Gehlert DR (1990) FEBS 264:125-129

Boston BA, Blaydon KM, Varnerin J, Cone RD (1997) Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. Science 278:1641-1644.

Bruckmaier RM, Pfeilsticker HU, Blum JW (1996) 63:191-200

Bruni JF, Van Vugt D, Meites J (1977) Life Sci 21:461-466

Capecci MR (1989) Science 244:-1288-1292

Carey, M (1998) The enhanceosome and transcriptional synergy. Cell 92:5-8.

Catania A y Lipton J (1993) Endocrine Reviews 14:564-576

Chajlani y Wikberg, 1992

Charron J y Drouin J (1986) Proc Natl Acad Sci USA 83:8903-8907

Cheung CC, Clifton DK, Steiner RA (1997) Proopiomelanocortin neurons are direct targets for leptin in the hypothalamus. Endocrinology 138:4489-4492.

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 162:156-159.

Civelli O, Birnberg N, Herbert E (1982) Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. J Biol Chem 257:6783-6787.

Clarke G y Wright DM (1984) Br. J. Pharmacol 83: 799-806.

Douglas AJ, Bicknell RJ, Russell JA (1995) Adv Exp Med Biol 395:381-394.

Drouin J, Trifiro M, Nemer m, Wrange O (1989) Mol Cell Biol 9:5305-5314

Drouin J, Lin Sun Y, Gauthier Y, Nemer M, Schmitdt J (1993) The Embo Journal 12:145-156

Eipper BA, Mains RE (1980) Structure and biosynthesis of proadrenocorticotrophin/ endorphin and related peptides. Endocrine Rev 1:1-27

Elkabes S, Loh YP, Wray S (1989) Brain Res Dev Brain Res 46:85-95

Evans MJ y Kaufman MH (1981) Nature 292:154-156

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD (1997) Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. Nature 385:165-168

Flood JF, Cherkin A, Morley J (1987) Brain res 422:218-234

Grosveld F, Blom van Assendelft GB, Greaves DR, & Kollias G (1987) Cell, 51, 975-985.

Gruber KA y Callahan MF (1989) Am J Physiol 257:681-694

Gutstein HB, Bronstein DM, Akil H (1992) Beta-endorphin processing and cellular origins in rat spinal cord. Pain 51:241-247.

Hammer GD, Fairchild-Huntress V, & Low M (1990) Mol Endo, 4, 1689-1697.

Hartman RD, Rosella-Dampman LM, Summy-Long JY (1987) Endocrinology 121:536-543

Hughes S, Smith ME(1993) Upregulation of the pro-opimelanocortin gene in spinal motoneurons in muscular dystrophy in mice. Neurosci Lett 163:205-207.

Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. Cell 88:131-141.

Izquierdo I y Dias R (1985) Psychoneuroendocrinology 10:165-172

Japón MA, Rubinstein M, Low MJ (1994) In situ hybridizarion analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. J Histochem Cytochem 42:1117-1125.

Jeanotte L, Trifiro LA, Plante RK, Chamberland M Drouin J (1987) Mol Cell Biol 7:4058-4064

Jin WD, Boutillier AL, Roberts JL (1994) Mol Endocrinology 8:1377-1388

Kjaer A, Knigge U, Warberg J (1995) Neuroendocrinology 61:167-172.

Klein MC, Hutchins PM, Gruber KA (1985) Life Sci 36:769-775

Lamonerie T, Tremblay JJ, Lanctot C, Therrien M, Gauthier Y, Drouin J (1996) Ptx1, a bicoid-related homeo box transcription factor involved in transcription of the pro-opiomelanocortin gene. Genes Dev 10:1284-1295.

Lee YC, Asa SL, Drucker DJ (1992) J Biol Chem 267:10705-10708

Li S, Crenshaw EB 3d, Rawson EJ, Simmons DM, Swanson LW, Rosenfeld MG (1990) Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene pit-1. Nature 347:528-533.

Li SJ, Varga K, Archer P, Hruby VJ, Sharma SD, Kesterson RA, Cone RD, Kunos G (1996) Melanocortin antagonists define two distinct pathways of cardiovascular control by alpha- and gamma-melanocyte-stimulating hormones. J Neurosci 15:5182-5188.

Lipton JM, Catania A (1997) Immunol Today 18:140-145

Liu B, Hammer GD, Rubinstein M, Mortrud M, Low MJ (1992) Identification of DNA elements cooperatively activating proopiomelanocortin gene expression in the pituitary glands of transgenic mice. Mol Cell Biol 12:3978-3990.

Liu D, Diorio J, Caldji C, Francis D, Freedman A, Pearson D, Plotsky P, Meaney M (1997) Science 277:1659-1621

Lonnerberg P, Lendahl U, Funakoshi H, Arhlund-Richter L, Persson H, Ibanez CF (1995) Regulatory region in choline acetyltransferase gene directs developmental and tissue-specific expression in transgenic mice. Proc Natl Acad Sci U S A 92:4046-4050.

Lundblad JR y Roberts JL (1988) Endocrinol rev 9: 135-158

Matera C y Wardlaw S (1993) Neuroendocrinology 58:493-500

Mellon, P.L., Windle, J.J., Goldsmith, P.C., Padula, C.A., Roberts, J. L., and Weiner, R. (1990) Neuron 5,1-10

Min N, Joh TH, Kim KS, Peng C, Son JH (1994) 5' upstream DNA sequence of the rat tyrosine hydroxylase gene directs high-level and tissue-specific expression to catecholaminergic neurons in the central nervous system of transgenic mice. Brain Res Mol Brain Res 27:281-289.

Morrel JI, Pfaff D (1981) Neuroendocrinology 41:417-426

Nishimori S, Young L, Guo Q, Wang Z, Insel T, Matzuk M M (1996) Proc. Natl. Acad. Sci 93:11699-11704

Olson GA, Olson R, Kastin A (1997) Peptides 17:1421-1466

Reisine T, Rougon G, Barbet J, Affolter HU (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:8261-8265

Riegel AT, Remenick RG Wolford DS, Berard J, Hager GL (1990) Nucleic Acid Research 18:4513-4521

Riegel At, Lu Y, Remenick J, Berard D S, Hager GL (1991) Mol Endo 5:1973-1982

Roselli-rehfus L, Mountjoy K, Mortrud M, Low MJ, Tatro JB, Simerly R, Cone RD (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8856-8860

Rubinstein, M., Mortrud, M., Liu, B., and Low, M. (1993) Neuroendocrinology 58, 373-380

Shwartzberg D.G y Nakane P.K (1983) Brain Research 276, 351-356

Simonet WS, Bucay N, Pitas RE, Lauer SJ, & Taylor J (1991) J Biol Chem, 266(14), 8651-8654.

Smith ME, Hughes S, Simpson MG, Allen SL (1994) Neurotoxicology 15:769-772

Smith IA y Funder JW (1988) Endocrine Reviews 9:135-1158

Therrien M y Drouin J (1991) Molecular and Cellular Biology 3492-3503

Thomas L, Leduc R, Thorne BA, Steiner DF, Thomas G (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:5397-5301

Tooze J, Frank R, Burke B J Cell Biol 105:155-162

Treiser y Wardlaw, 1992) y péptidos opioides endógenos (

Tremblay Y, Tretjacoff I, Peterson A, Antakly T, Xian Zhang C, Drouin J (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8890-8894

Tremblay JJ, Lanctot C, Drouin J (1998) Mol Endocrinoloy 12:428-441

Ueda T, Yokoyama Y, Irahara M, Aono T (1994) Obstet Gynecol 84:259-262

Wardlaw S (1986) Endocrinology 119:19-24

Watson SJ, Akil H, Richard CW, & Barchas J (1978) Science, 200, 1180-1182.

Yang, Z., and Lim A.T. (1995) Brain Research 678,251-258

Dr. Marcelo Rubinstein