



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PARTICIPACIÓN DEL RECEPTOR CRH-R2 DEL NUCLEO PARAVENTRICULAR  
HIPOTALÁMICO EN LA REGULACIÓN DE LA CONDUCTA ALIMENTARIA DE RATAS  
SOMETIDAS A ESTRÉS POST-NATAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

M. en C. Viridiana Alcántara Alonso

TUTOR PRINCIPAL

[Dra. Patricia Bertha Judith de Gortari Gallardo](#)  
[Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

[Dr. Federico Bermúdez Rattoni](#)  
[Instituto de Fisiología Celular UNAM](#)

[Dr. Iván Velasco Velázquez](#)  
[Instituto de Fisiología Celular UNAM.](#)

Ciudad de México. Febrero, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

En este trabajo de tesis quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis padres y a mi hermana ya que sin su apoyo no hubiera sido posible para mí estudiar y llevar a término este grado académico.

De manera muy especial agradezco a la Doctora Patricia de Gortari. Bajo su tutela me formé profesionalmente como investigadora y maduré personalmente. Gracias por guiarme y enseñarme cómo hacer investigación de manera ética y respetuosa con la ciencia.

Doy las gracias a mis compañeros del laboratorio de Neurofisiología Molecular: Mariana, Elena, Isabel, Paulina, Cinthia y Gilberto. En ellos he encontrado siempre amistad, ayuda, aprendizaje y cariño en todo el tiempo que llevamos de conocernos.

De igual forma agradezco al Dr. Dimitris Grammatopoulos la oportunidad y el apoyo que me brindó para realizar la estancia de investigación en su laboratorio y a Sarah y Pamela por otorgarme su ayuda, amistad y compañía mientras estuve lejos de mi casa.

Agradezco al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente por el espacio y los recursos utilizados para la realización de este trabajo de investigación. A la Universidad Nacional Autónoma de México por aceptarme como parte de su comunidad educativa brindándome una formación integral y al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado por su ayuda en el financiamiento de la asistencia al LVII Congreso de Ciencias Fisiológicas en la Ciudad de Oaxaca en 2014 y de la estancia de investigación realizada en el Reino Unido en 2016 y 2017.

Doy mi agradecimiento también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca nacional y mixta que me otorgó durante los estudios de doctorado.

## RESUMEN

La activación del receptor 2 de la hormona liberadora de corticotropina (CRH-R2) del núcleo paraventricular hipotalámico (NPV) por sus ligandos CRH o urocortinas (Ucn2 y Ucn3), causa anorexia durante el estrés agudo. Sin embargo, un estrés crónico post-natal como la separación materna (SM) en ratas provoca el desarrollo de hiperfagia, sugiriendo que el CRH-R2 podría estar desensibilizado.

El objetivo del presente trabajo fue definir la participación del CRH-R2 en la conducta alimentaria de ratas adultas sometidas a SM post-natal. Para esto, se estudiaron cambios en la expresión genética del CRH-R2 y de sus ligandos en el NPV de ratas control y SM. Se evaluó el contenido proteico del receptor y su funcionalidad, cuantificando el consumo de alimento, la formación de AMPc y la fosforilación de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) después de inyectar Ucn2 al NPV de las ratas adultas. Adicionalmente, se utilizó un modelo *in vitro* para analizar la fosforilación de la cinasa activada por AMP (AMPK) y la síntesis de péptidos anorexigénicos en respuesta a la Ucn2.

Los animales con SM presentaron hiperfagia, incremento en el RNAm de CRH, Ucn2 y CRH-R2 aunque, el contenido proteico de CRH-R2 no cambió en el NPV comparados con los controles. La administración de Ucn2 a ratas control disminuyó su consumo de alimento, contenido de AMPc y aumentó la fosforilación de CREB. En cambio, los animales del grupo SM no respondieron a la inyección de Ucn2. En el modelo *in vitro*, la activación de CRH-R2 en neuronas hipotalámicas disminuyó la fosforilación de AMPK, pero presentó resistencia a disminuir con un segundo estímulo de Ucn2. De manera similar, una sola exposición a Ucn2 incrementó el RNAm de proopiomelanocortina y neurotensina, mientras que 2 administraciones inhibieron su síntesis.

Los resultados indican que en la SM, la exposición constante del receptor CRH-R2 hipotalámico a la Ucn2 puede alterar su señalización y funcionalidad, facilitando la hiperfagia.

## **ABSTRACT**

Activation of the corticotropin-releasing hormone type 2 receptor (CRH-R2) in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) by its ligands CRH or urocortins (Ucn2 and Ucn3), inhibits food intake during acute stress. However, chronic post-natal stress in rats like maternal separation (MS) promotes the development of hyperphagia, suggesting that CRH-R2 could be desensitized.

The aim of this work was to define CRH-R2 involvement in the modulation of feeding behavior of adult rats subjected to post-natal MS. Changes in the gene expression of CRH-R2 and its ligands in the PVN were studied in MS and control rats. CRH-R2 protein concentration and functionality were also analyzed by the quantification of food intake, cAMP production and phosphorylation of the cAMP response element binding protein (CREB) after an intra-PVN injection of Ucn2 in control and MS adults. In addition, an *in vitro* model was used to assess the phosphorylation of the AMP activated protein kinase (AMPK) and the synthesis of anorexigenic peptides in response to Ucn2 treatment.

Animals submitted to MS stress showed hyperphagia and increases in the mRNA expression of CRH, Ucn2 and CRH-R2 in the PVN although, CRH-R2 protein concentration did not change compared to controls. Injection of Ucn2 to control rats decreased food intake, cAMP concentration and increased CREB phosphorylation in the PVN. Conversely, MS animals did not respond to Ucn2 injection. In the *in vitro* model, activation of CRH-R2 with Ucn2 in hypothalamic neurons, decreased AMPK phosphorylation but it showed a resistance to decrease with a second treatment of Ucn2. Likewise, a single Ucn2 treatment increases the mRNA expression of proopiomelanocortin and neurotensin, while 2 treatments with Ucn2 inhibit the synthesis of these peptides.

The results indicate that the MS promotes a continuous activation of hypothalamic CRH-R2 by Ucn2 which may change its signaling and functionality, facilitating the development of hyperphagia.

# ÍNDICE

1. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Receptores a la CRH.....	1
1.2 Papel de CRH-R2 hipotalámico en la conducta alimentaria.....	4
1.2.1 Regulación del apetito a nivel hipotalámico.....	4
1.2.2 Efecto anorexigénico de la activación del CRH-R2 hipotalámico.....	6
1.2.3 Regulación de la expresión y funcionalidad de CRH-R2.....	7
1.3 Vías de señalización involucradas en el control del consumo de alimento.....	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
3. JUSTIFICACIÓN.....	11
4. HIPÓTESIS.....	12
5. OBJETIVOS.....	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
6.1 Procedimiento experimental <i>in vivo</i> .....	13
6.2 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	15
6.2.1 Extracción de RNA.....	15
6.2.2 Transcripción de RNA total a DNA complementario (DNAc).....	16
6.2.3 PCR en tiempo real.....	17
6.3 Inmunodetección con la técnica de Western Blot.....	18
6.3.1 Extracción de proteínas.....	18
6.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	18
6.3.3 Inmunodetección.....	19
6.3.4 Revelado y análisis de imagen.....	19
6.3.5 Western Blot de muestras de cultivo celular.....	20
6.4 Tinción de Nissl en tejido cerebral.....	20
6.5 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA).....	21
6.6 Procedimiento experimental <i>in vitro</i> .....	21
6.7 Microscopia Confocal.....	21
6.8 Análisis estadístico.....	22

7. RESULTADOS.....	23
<u>Resultados de experimentos <i>in vivo</i></u> .....	23
7.1 Consumo de alimento y ganancia de peso corporal.....	23
7.2 Expresión genética del sistema de CRH en el NPV.....	24
7.3 Expresión de la proteína CRH-R2 en la fracción citosólica y membranal del NPV.....	25
7.4 Comprobación de la trayectoria de la cánula al NPV.....	26
7.5 Consumo de Alimento de las ratas administradas con vehículo o Ucn2.....	27
7.6 Fosforilación de CREB después de la inyección de vehículo o Ucn2 en el NPV.....	28
7.7 Concentración de AMPc después de la inyección de vehículo o Ucn2 en el NPV.....	29
<u>Resultados de experimentos <i>in vitro</i></u> .....	30
7.8 Expresión de CRH-R2 en la línea celular mHypoA-2/30.....	30
7.9 Fosforilación de CREB con la adición de Ucn2.....	30
7.10 Fosforilación de AMPK con la adición de Ucn2.....	31
7.11 Distribución intracelular de Ucn2 después de su estimulación con Ucn2.....	32
7.12 Efecto de un tratamiento prolongado con Ucn2 sobre la fosforilación de CREB.....	34
7.13 Efecto de un tratamiento prolongado con Ucn2 sobre la fosforilación de AMPK.....	35
7.14 Expresión del RNAm de péptidos asociados con el consumo de alimento con Ucn2.....	36
7.15 Expresión de la proteína y RNAm de CRH-R2 en las células mHypoA-2/30 con Ucn2.....	37
8. DISCUSIÓN.....	38
8.1 Consumo de alimento y ganancia de peso .....	38
8.2 Expresión genética de los receptores a CRH y sus ligandos en el NPV.....	39
8.3 Expresión proteica de CRH-R2 en el NPV.....	41
8.4 Funcionalidad del CRH-R2 en el NPV.....	42
8.5 Expresión y funcionalidad del CRH-R2 en la línea celular mHypoA-2/30.....	44
8.6 Monitoreo de la localización de CRH-R2 en la línea celular mHypoA-2/30.....	45
8.7 Efecto del tratamiento prolongado con Ucn2 sobre la fosforilación de CREB y AMPK.....	45
8.8 Efecto del CRH-R2 sobre la expresión de péptidos moduladores del apetito.....	47
8.9 Expresión de CRH-R2 con los diferentes tratamientos de Ucn2 en células mHypoA-2/30.....	48
9. CONCLUSIONES.....	49
10. REFERENCIAS.....	50
11. ANEXOS (Publicaciones).....	58

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Activación de los receptores a CRH.....	2
<b>Figura 2.</b> Principales núcleos y neuropéptidos involucrados en la regulación del apetito.....	5
<b>Figura 3.</b> Consumo y ganancia de peso de animales con SM.....	23
<b>Figura 4.</b> Expresión del RNAm del sistema CRH en el NPV de animales con SM.....	24
<b>Figura 5.</b> Expresión proteica de CRH-R2 en la membrana y citosol de animales con SM.....	25
<b>Figura 6.</b> Trayectoria de la cánula hacia el NPV.....	26
<b>Figura 7.</b> Consumo de alimento total durante las 24 h posteriores a la administración de Ucn2.....	27
<b>Figura 8.</b> Relación entre la expresión de P-CREB/CREB después de las inyecciones de Ucn2.....	28
<b>Figura 9.</b> Concentración de AMPc después de la administración de Ucn2.....	29
<b>Figura 10.</b> Expresión de CRH-R2 en mHypoA-2/30.....	30
<b>Figura 11.</b> Incremento en la fosforilación de CREB con Ucn2 en las células mHypoA-2/30.....	30
<b>Figura 12.</b> Inhibición en la fosforilación de AMPK con Ucn2 en las células mHypoA-2/30.....	31
<b>Figura 13.</b> Efecto de la Ucn2 sobre la localización del CRH-R2 en células mHypoA-2/30.....	32
<b>Figura 14.</b> Localización del CRH-R2 después de 1, 2 ó 4 horas de estimulación con Ucn2.....	33
<b>Figura 15.</b> Fosforilación de CREB a consecuencia del tratamiento de Ucn2 sencillo y doble.....	34
<b>Figura 16.</b> Fosforilación de AMPK a consecuencia del tratamiento de Ucn2 sencillo y doble.....	35
<b>Figura 17.</b> Expresión del RNAm de los péptidos moduladores del apetito con Ucn2.....	36
<b>Figura 18.</b> Expresión de proteína y RNAm de CRH-R2 con los diferentes tratamientos de Ucn2.....	37

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Cambios en la expresión del CRH-R2 del NPV hipotalámico.....	7
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizados.....	17



## **Lista de abreviaturas utilizadas**

**ACTH** Corticotropina

**AgRP** Proteína relacionada al Agouti

**AMPK** Cinasa activada por adenosín monofosfato

**ASG30** Antisauvagina 30

**CREB** Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

**CRH** Hormona liberadora de corticotropina

**CRH-R1** Receptor tipo 1 a la hormona liberadora de corticotropina

**CRH-R2** Receptor tipo 2 a la hormona liberadora de corticotropina

**EW** Núcleo de Edinger-Westphal

**GRK** Cinasa de proteínas-acopladas-a-proteína G

**HPA** eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal

**HVM** Hipotálamo ventro-medial

**i.c.v.** Inyección intracerebroventricular

**NPV** Núcleo paraventricular hipotalámico

**NPY** Neuropeptido Y

**ObRb** Receptor de leptina

**PDEs** Fosfodiesterasas

**POMC** Proopiomelanocortina

**SM** Separación materna

**SNC** Sistema Nervioso Central

**TATABP** Proteína de unión a la caja TATA

**TRH** Hormona liberadora de tirotrópina

**Ucns** Urocortinas

## **1. ANTECEDENTES**

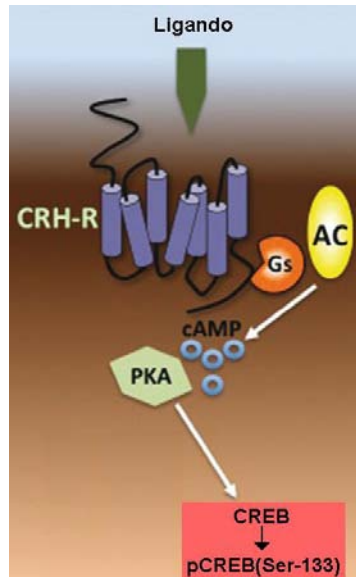
El estrés se define como cualquier estímulo que altera la homeostasis del organismo. En los mamíferos dicho estímulo puede ser de carácter físico o psicológico, y poner en riesgo la supervivencia del individuo. La capacidad de dar respuesta al estrés depende de adaptaciones fisiológicas por medio de las cuales el animal enfrenta la situación amenazante. El principal control de la respuesta al estrés se da a nivel central por acción neuroendócrina de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que es un péptido encargado de modular en los mamíferos el mantenimiento de la homeostasis a través de la activación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal (HPA). La CRH es sintetizada en la división parvocelular del Núcleo Paraventricular Hipotalámico (NPV) [1] y liberada de las terminales axónicas de este núcleo hacia el sistema portal-hipofisiario. Cuando se une a su receptor en los corticotropos de la pituitaria anterior la CRH activa la síntesis y liberación de corticotropina (ACTH) hacia el torrente sanguíneo. La ACTH actúa a su vez sobre sus receptores de la corteza de las glándulas suprarrenales, estimulando la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos, corticosterona en roedores) cuya elevación transitoria activa la disponibilidad de reservas energéticas que le permiten al individuo enfrentarse a la amenaza y favorecer su supervivencia.

Además de su papel neuroendocrino como reguladora del eje HPA, la CRH también tiene un papel neuromodulador favoreciendo en regiones extra-hipotalámicas el estado de alerta, la conducta ansiosa, la percepción del peligro y procesos de aprendizaje asociados al reconocimiento de una amenaza [1;2].

### **1.1 Receptores a la CRH**

Los efectos fisiológicos de la CRH son consecuencia de la activación de sus 2 tipos de receptores: CRH-R1 y CRH-R2, proteínas de 7 dominios trans-membranales codificadas por diferentes genes. Estos, forman parte de la subfamilia B1 de receptores acoplados a proteína G, los receptores que se expresan en el cerebro están principalmente acoplados a proteínas  $G\alpha_s$  [3]; la unión de su ligando desencadena la activación de enzimas adenil ciclasas que incrementan la concentración intracelular de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) a partir de ATP [4]. El aumento de AMPC favorece su unión al sitio regulador de la proteína cinasa A (PKA), lo que libera a las cadenas catalíticas de dicha enzima, provocando la fosforilación de residuos de serina y treonina de diversas proteínas y factores de transcripción como la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPC (CREB) en su residuo de serina 133 [5].

Aunque ambos receptores comparten el 70% de homología con regiones idénticas de la proteína en segmentos cruciales para el acoplamiento con proteínas G y para la transmisión de la señal [3] (Figura 1), la CRH tiene mayor afinidad por el receptor CRH-R1 que por CRH-R2 [3].



**Figura 1.** Activación de los receptores a CRH. Modificado de Grammatopoulos. Br J Pharmacol 2012[3]

Los 2 tipos de receptores tienen diferente distribución en el Sistema Nervioso Central (SNC). El CRH-R1 se expresa en la corteza cerebral, cerebelo, tallo encefálico, septum e hipocampo, pero su expresión es muy baja en el hipotálamo [6;7]. En la pituitaria CRH-R1 es el receptor que predomina, por lo que se considera el mediador de la liberación de ACTH en respuesta a estímulos estresantes [7].

Del receptor tipo 2 se han demostrado 3 subtipos funcionales: CRH-R2 $\alpha$ , CRH-R2 $\beta$  y CRH-R2 $\gamma$  [8;9], de los cuales CRH-R2 $\beta$  es el que tiene una respuesta más potente a la estimulación por el ligando y se encuentra distribuido principalmente en tejidos periféricos como el corazón, el pulmón y el músculo esquelético [9;10]. CRH-R2 $\gamma$  se ha identificado únicamente en el cerebro (septum e hipocampo) del humano [9], mientras que la variante CRH-R2 $\alpha$  es la más expresada en el septum lateral, el rafe dorsal, la amígdala y el hipotálamo tanto en primates como en roedores [6;7].

La función del CRH-R2 en la regulación del eje HPA no está completamente establecida ya que por un lado, ratones *knock-out* para este receptor que se someten a un estrés agudo, tienen elevación en la concentración de corticosterona por un tiempo más prolongado que los animales *wild-type*, lo cual indicaría que la activación del receptor es

necesaria para inhibir al eje adrenal [11]. Por otro lado, al impedir la expresión proteica de CRH-R2 con oligonucleótidos anti-sentido administrados intra cerebro-ventricularmente (i.c.v.), se atenúa la estimulación de la CRH sobre el eje HPA [12], sugiriendo que el CRH-R2 incrementa la actividad del eje adrenal como se ha observado con la administración central de sus agonistas específicos [13].

Aunque su función en la respuesta al estrés es controversial, el CRH-R2 del cerebro tiene un papel fundamental y bien definido en la regulación de la conducta alimentaria. Durante el estrés agudo, uno de los efectos neuromoduladores de la CRH es la reducción del consumo de alimento, efecto que es bloqueado con la administración de oligonucleótidos antisentido a CRH-R2 o con la inyección de antagonistas específicos a CRH-R2 y no a CRH-R1 [12;14]. Además, la inyección de ligandos específicos de CRH-R2 llamados urocortinas (Ucns) también genera anorexia [14-16]. Estos estudios revelan la participación del CRH-R2 en el efecto anorexigénico de sus ligandos.

Las Ucns tienen un efecto más potente y prolongado en la inhibición del consumo de alimento que la CRH [14-16]. De éstas hay 3 tipos: la Ucn1 que es un péptido de 40 aminoácidos con una secuencia 45% similar a la de CRH y una afinidad equivalente para unirse al CRH-R1 o al CRH-R2 (Ki de 0.4 nM para CRH-R1 y 0.3 nM para CRH-R2) [17], encontrándose su principal expresión de RNAm en el núcleo de Edinger-Westphal (EW) localizado en el mesencéfalo y en menor proporción en los núcleos rafé dorsal, supraóptico y en la *substantia nigra* [14]. El contenido y expresión del RNAm de Ucn1 en el EW se incrementa con estímulos estresantes agudos como la restricción de movimiento [18] y sostenidos como el estrés crónico variable por 14 días [19], lo que implica a este péptido como constituyente del circuito de respuesta al estrés del organismo.

La Ucn2 es un análogo de la CRH de 38 aminoácidos con una homología de 34% y mayor afinidad por el receptor CRH-R2 (Ki de 1.7 nM para la Ucn2 vs 42 nM para la CRH) [17]. Se expresa en los núcleos hipotalámicos supraóptico, arcuato y NPV [14]; también es sintetizado en el *locus coeruleus*, el septum lateral y el núcleo medial de la amígdala [4;20]. En animales expuestos a estrés por inmovilidad, el RNAm de la Ucn2 se incrementa en neuronas parvocelulares del NPV en donde colocaliza con 45% de las neuronas CRHérgicas [21]. De igual manera la administración del glucocorticoide sintético dexametasona incrementa la expresión de Ucn2 en el NPV [22], lo que indica su participación en la respuesta al estrés y su regulación positiva por glucocorticoides [17].

La Ucn3 también de 38 aminoácidos y 26% de homología con CRH [14] se sintetiza de manera predominante en el núcleo preóptico medial, el NPV y el medial de la amígdala

[23]. Muchas terminales nerviosas que contienen Ucn3 se han identificado en regiones que expresan altos niveles del CRH-R2 como el septum lateral y el hipotálamo ventromedial (HVM) [4]. Su inyección i.c.v. también provoca la activación del eje HPA [23] y el estrés agudo por restricción de movimiento incrementa la expresión de Ucn3 en el NPV [24].

De esta manera, el sistema de respuesta al estrés se conforma de la activación de CRH-R1 y CRH-R2 a través de la unión no solo de la CRH sino también de la Ucn1, Ucn2 y Ucn3.

## **1.2 Papel de CRH-R2 hipotalámico en la conducta alimentaria**

### *1.2.1 Regulación del apetito a nivel hipotalámico*

Una de las estructuras cerebrales involucradas en la regulación de la conducta alimentaria es el hipotálamo, el cual está dividido en núcleos con funciones como el control del metabolismo, el balance hídrico, la función reproductiva, los ritmos circadianos y conductas motivacionales asociadas a estados de hambre y saciedad [25]. Los núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la conducta alimentaria son el arcuato, dorsomedial, lateral, el HVM y el NPV.

Las lesiones en el núcleo arcuato traen como consecuencia hiperfagia y obesidad [26]. Este núcleo está localizado en la base del hipotálamo, en donde la barrera hematoencefálica es semi-permeable por lo que recibe señales del estado energético desde la periferia, como por ejemplo de las hormonas insulina, grelina y leptina [27]. De acuerdo a la señal recibida, se activa una de sus sub-poblaciones neuronales: aquellas que sintetizan péptidos orexigénicos (neuropéptido Y -NPY-/proteína relacionada al Agouti -AgRP-) o bien las que expresan péptidos anorexigénicos (propiomelanocortina -POMC-/Transcrito regulado por cocaína y anfetaminas -CART-) [27].

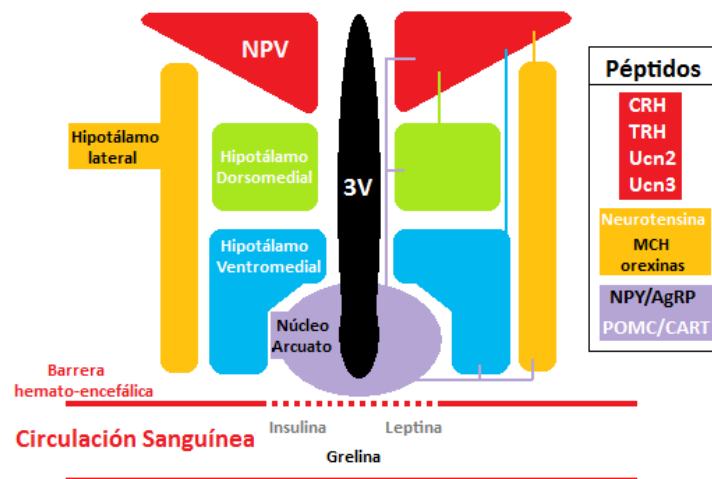
El núcleo arcuato tiene proyecciones de ambas sub-poblaciones hacia el núcleo dorsomedial, otra zona cuya lesión provoca obesidad y que a su vez envía señales anorexigénicas a neuronas del NPV [27] (Fig. 2).

El hipotálamo lateral también recibe proyecciones neuronales del núcleo arcuato, aquí se sintetizan otros péptidos anorexigénicos como la neurotensina [28], y orexigénicos como la hormona concentradora de melanina (MCH) y las orexinas [27]. También hay proyecciones orexinérgicas desde el hipotálamo lateral hacia el NPV [29] (Fig. 2).

La participación del HVM y NPV en la modulación del apetito se ha observado también con lesiones en estas áreas, las que incrementan el consumo de alimento durante la fase nocturna del ciclo circadiano con mayor intensidad en los animales lesionados en el NPV que en los lesionados en el HVM [30].

En el NPV convergen las señales aferentes de estos otros núcleos hipotalámicos (Fig. 2) [24;27;29] y sus eferentes dan respuesta a dichas señales con la activación de regiones del sistema nervioso autónomo como el núcleo del tracto solitario y el núcleo parabraquial, modulando la conducta alimentaria [31].

Adicionalmente en condiciones de balance energético positivo, se incrementa la síntesis de hormonas anorexigénicas como la hormona liberadora de tirotrina (TRH) y la CRH en neuronas parvocelulares del NPV [32]. La liberación de estas hormonas desencadena la inhibición del consumo de alimento y la activación de los ejes neuroendócrinos tiroideo y adrenal, los cuales finalizan con la liberación de hormonas tiroideas y glucocorticoides, ambas involucradas en la regulación del metabolismo y el gasto de las reservas energéticas [32].



**Figura 2.** Principales núcleos y neuropéptidos hipotalámicos involucrados en la regulación del apetito. El núcleo arcuato recibe señales periféricas que transmite al resto de los núcleos a través de la liberación de péptidos anorexigénicos y orexigénicos. Todas las señales convergen en el NPV en donde se da respuesta con la síntesis o inhibición de hormonas anorexigénicas [24;27].

Aunque se conoce poco sobre la regulación de la expresión de las Ucn2 y 3 en el NPV con estímulos provenientes de estos otros núcleos hipotalámicos, en condiciones de estrés agudo, las neuronas del HVM que se activan (determinado por la expresión de *Fos*) proyectan sus axones hacia el NPV y estimulan la expresión del RNAm de Ucn3 [24], lo cual contribuiría al efecto anorexigénico global observado en situaciones transitorias de estrés.

### *1.2.2 Efecto anorexigénico de la activación del CRH-R2 hipotalámico*

En el hipotálamo los núcleos NPV e HVM son los que presentan mayor expresión de CRH-R2 [6]. El estudio de la función de CRH-R2 en el HVM ha recibido más atención y en la actualidad se conoce que este receptor participa de manera importante en la inhibición del consumo de alimento causada por la CRH y las Ucn3 [11;15;23]. La administración de un small hairpin RNA (shRNA) para silenciar la expresión de CRH-R2 en el HVM incrementa el consumo de alimento, el volumen de tejido adiposo blanco y los niveles de leptina circulantes [33], evidenciando la participación del CRH-R2 del HVM en la ingesta de alimento y en el gasto energético.

El CRH-R2 del HVM contribuye además a la acción anorexigénica de la leptina puesto que dicha hormona incrementa la expresión de CRH-R2 en este núcleo hipotalámico [34]. De hecho, ratas Zucker obesas que tienen una mutación en el gen que codifica para el receptor de leptina, presentan menor expresión del RNAm de CRH-R2 en el HVM lo cual podría contribuir a la hiperfagia que desarrollan [35]. El estrés crónico también modula la expresión del CRH-R2 del HVM ya que la restricción de movimiento en ratas adultas ó 24 horas de separación de la madre en crías de 9 días de edad son estímulos estresantes que disminuyen la expresión del RNAm de CRH-R2 en el HVM [36;37], aunque no se ha estudiado cómo esto afecta el consumo de alimento del animal.

En el NPV, la activación del CRH-R2 también tiene efecto anorexigénico [15;38], aunque su función está menos estudiada que en el HVM y resulta importante definirlo porque en el NPV se integran las señales provenientes de otros núcleos hipotalámicos en función de cambios en el balance energético, modificando el apetito en coordinación con dichas señales [30;39].

La administración de CRH intra-NPV en roedores inhibe su consumo de alimento [40] e incrementa la concentración de leptina plasmática [39], posiblemente actuando sobre CRH-R2, cuya expresión en el NPV es mayor a la de CRH-R1 [6]. Debido a la falta de estudios relacionados y al papel integrador de señales aferentes de diferentes regiones y núcleos hipotalámicos que tiene el NPV, el estudio de la funcionalidad de CRH-R2 en esta región durante situaciones de estrés crónico se convierte en relevante, como un factor que podría modificar la conducta alimentaria.

### 1.2.3 Regulación de la expresión y funcionalidad de CRH-R2

Al evaluar posibles cambios en la expresión del RNAm de CRH-R2 en el NPV como respuesta a diferentes retos metabólicos, se ha observado que no se modifica con 48 h de ayuno total [36], pero se incrementa en la restricción alimentaria (25% del consumo *ad libitum*) por 7 días y disminuye en animales sometidos a un modelo de anorexia inducida por deshidratación; en éstas últimas, el consumo de alimento voluntario disminuye y la inyección intra-NPV del antagonista específico a CRH-R2, antisauvagina 30 (ASG30), incrementa su consumo de alimento. Lo anterior parece indicar que cuando el receptor está activado, los animales tienen anorexia provocando una disminución del RNAm del receptor y que su bloqueo farmacológico con ASG30, atenúa la conducta anoréxica [38]. Por el contrario, ratas adultas que desarrollan hiperfagia y mayor ganancia de peso como resultado de estrés por separación materna (SM) durante la lactancia, presentan incremento en la expresión genética del CRH-R2 en el NPV [41] (Tabla 1).

Alimentación	Conducta Alimentaria	RNAm del CRH-R2 en el NPV
<i>ad libitum</i>		100%
anorexia inducida por deshidratación	Inhibición del consumo de alimento	70%
Restricción alimentaria forzada	Hambre	120%
Estrés por separación materna	Incremento en el consumo de alimento	200%

**Tabla1.** Cambios en la expresión del CRH-R2 del NPV hipotalámico en respuesta a condiciones que modifican el consumo de alimento del animal [38;41].

Debido a que la disminución del RNAm de CRH-R2 en el NPV se asocia con la conducta de anorexia [38] y a que CRH-R2 tiene un efecto anorexigénico [15], es posible que su funcionalidad en los adultos con estrés post-natal por SM esté inhibida, vinculándose con aumento en la expresión del receptor e incremento en consumo de alimento y peso corporal.

Este mayor consumo de alimento y peso se ha observado también en otros modelos animales de estrés crónico como el psicosocial generado por la presencia de un animal dominante en la misma caja de un animal subordinado, generándose hiperfagia en el animal estresado (subordinado) [42]. Así mismo, ratas inmovilizadas por 120 min durante 15 días incrementan su consumo de alimento [43].



De manera interesante, animales transgénicos que sobre-expresan CRH tienen mayor consumo de alimento y acumulación de grasa al compararlos con animales *wild-type* [44;45]. Estas evidencias indican que la activación constante de CRH-R2 por sobre-expresión de la CRH o bien por la exposición a estrés crónico podría disminuir su funcionalidad incrementando la vulnerabilidad del animal a desarrollar hiperfagia y como consecuencia sobrepeso/obesidad. De hecho, animales *knock-out* para CRH-R2 presentan incremento en el consumo de alimento en la fase de oscuridad del ciclo circadiano [46], confirmando su participación en el control del apetito.

Los experimentos *in vitro* también muestran que el CRH-R2 puede desensibilizarse de manera homóloga al ser activado sostenidamente por sus agonistas (CRH, Ucn2 o Ucn3) [47;48]. La hiperactivación del receptor favorece su fosforilación por una cinasa de proteínas-acopladas-a-proteína G (GRK). Esto incrementa la internalización del receptor CRH-R2 desde la membrana plasmática al citosol, proceso en el que interviene el acarreamiento de  $\beta$ -arrestina del tipo 2. Con este proceso disminuye la magnitud de la señalización intracelular del CRH-R2 inducida con ligandos subsecuentes [47]. De manera particular, la Ucn2 es más potente desensibilizando al CRH-R2 que la CRH o la Ucn3 en células HEK 293 provenientes del riñón ó Y79 de retinoblastoma humano [47-49], debido a la mayor afinidad de la Ucn2 por el receptor CRH-R2.

Hasta el momento no se ha analizado si la expresión de las Ucns está incrementada en los animales con SM y dado su efecto en la desensibilización homóloga del CRH-R2 observado *in vitro* es importante investigarlo. En cuanto a la CRH, la SM provoca incrementos en la expresión de su RNAm en el NPV, en su traducción a proteína y en su liberación, así como en la concentración sérica de corticosterona, el paso final de la activación del eje HPA [41;50;51]. Sin embargo, la CRH y la corticosterona se descartan como responsables del incremento observado en el RNAm de CRH-R2 en el NPV de los animales con SM, debido a que la administración i.c.v. de la CRH no modifica la expresión del receptor en este núcleo [52] y ni la inyección de corticosterona sistémica, ni la adrenalectomía aumentan la síntesis de CRH-R2 en el NPV [36]. Esto ocurre a pesar de que la región promotora del gen del CRH-R2 tiene elementos de respuesta al receptor de glucocorticoides (GRE) [53] por medio de los que se incrementa su expresión en el HVM y no en el NPV [36], lo que significa que su regulación es región específica probablemente determinada por el conjunto de estímulos que se reciben en cada núcleo hipotalámico.

Habiendo descartado tanto a la corticosterona como a la CRH como responsables del aumento en la expresión de CRH-R2 de ratas adultas con SM, es necesario el análisis de la expresión de los ligandos específicos para CRH-R2: Ucn2 y Ucn3 [4] en el NPV de animales con SM ya que son sintetizadas en este núcleo [14;23], también tienen efecto anorexigénico, y actúan paracrinamente [15]. El estrés crónico de la SM pudo modificar la síntesis de las Ucn2 y 3 y de su receptor CRH-R2.

Actualmente no se conocen los cambios en la expresión de la Ucn2 en el NPV en condiciones de estrés crónico, cuando también podría alterarse el consumo de alimento del individuo. En cuanto a la Ucn3, se conoce que el estrés psicológico por 5 días (en ratas que observan los efectos de una corriente eléctrica aplicada a las patas de otras ratas) incrementa el RNAm de la Ucn3 en el tejido hipotalámico [54] pero específicamente en el NPV tampoco se han descrito cambios en la expresión de Ucn3 en condiciones de estrés crónico por lo que es necesario estudiar el efecto del estrés por SM sobre el RNAm de estos ligandos.

### **1.3 Vías de señalización involucradas en el control del consumo de alimento**

Como se mencionó anteriormente el receptor CRH-R2 está acoplado a proteína  $G\alpha_s$  por lo que su estimulación activa a la PKA y la fosforilación de CREB. Este factor de transcripción se incrementa en el NPV en condiciones de alimentación después de un ayuno de 48 h [55] y es un regulador positivo de la síntesis de TRH y CRH en neuronas parvocelulares [56;57] con lo cual se inhibe la conducta de ingesta de alimento.

Pero esta vía de segundos mensajeros no es la única, la actividad de la cinasa activada por AMP (AMPK) está regulada en el NPV por las señales que se reciben del núcleo arcuato. La unión de AgRP al receptor de melanocortina-4 (MC4) (del que es un antagonista) activa a la enzima en el NPV, mientras que su actividad disminuye en condiciones de re-alimentación después del ayuno y con la administración de leptina [58] inhibiendo la conducta alimentaria. Por el contrario, la inyección de un activador de la AMPK directamente al NPV tiene un efecto orexigénico [59].

Esta enzima responde directamente a cambios en la disponibilidad de energía intracelular al ser activada de forma alostérica por un incremento en la concentración de AMP y déficit en la concentración de ATP intracelular. Como consecuencia de la activación de AMPK se favorece la producción de ATP a través de vías catabólicas, mientras que las vías anabólicas se inhiben [60]. De esta manera, la AMPK es un sensor energético que

además promueve la síntesis de péptidos orexigénicos (NPY/AgRP) e inhibe la de anorexigénicos (POMC) en neuronas del núcleo arcuato; por medio de la activación de moléculas que responden a su vía de segundos mensajeros intracelulares como el complejo mTOR1 (blanco de rapamicina en células de mamífero 1) [61].

En este sentido, se conoce que la unión de señales periféricas de abasto de energía como las hormonas insulina y leptina a sus receptores hipotalámicos en el núcleo arcuato genera la inhibición de la actividad de la AMPK, mientras que la activación de los receptores de grelina genera incrementos en la fosforilación de AMPK en el residuo treonina 172 de la subunidad catalítica  $\alpha$ , lo que estimula su actividad cinasa [60].

No obstante, aún no se estudia si la actividad de la AMPK se modifica con la activación de CRH-R2 por las Ucn3 ni si esta enzima participa en el efecto anorexigénico del sistema de CRH.

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El desarrollo de hiperfagia en las ratas con estrés por SM durante el periodo de lactancia podría estar asociado a una disminuida funcionalidad del CRH-R2 en el NPV.

La administración periférica e i.c.v. de la Ucn2 disminuye el consumo de alimento [16;62;63], al igual que la administración i.c.v e intra-NPV de Ucn3 [15;64]. Sin embargo, no se conoce de qué manera un estrés crónico como el provocado por la SM puede modificar la expresión de estos péptidos en el NPV ni la funcionalidad del CRH-R2 o su efecto anorexigénico por lo que su análisis en animales adultos sometidos a este modelo de estrés post-natal resulta relevante.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha estudiado el desarrollo de padecimientos vinculados a desórdenes del eje adrenal como ansiedad, depresión, síndrome de estrés post-traumático y trastornos de la alimentación, derivados de experiencias estresantes en la infancia como violencia intra-familiar, negligencia, abuso físico o la pérdida de un padre [65;66].

El estrés crónico en la infancia también se ha asociado al desarrollo de síndrome metabólico, trastorno conformado por: resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensión arterial y obesidad [67]. Estas enfermedades tienen un alto costo social y económico para países como México en donde existe una prevalencia de 71.5 % de sobrepeso y obesidad en adultos [68].

La principal causa de sobrepeso y obesidad es un aumento en el consumo de alimento comparado con el gasto energético del individuo y dentro de los factores asociados a la incrementada ingesta se encuentra el estrés crónico [69]. Diferentes tipos de estrés en la infancia se han asociado al incremento en el consumo de alimento desde la adolescencia o en la adultez y como consecuencia a sobrepeso y obesidad [70-73].

En México 60% de los menores de edad vive por debajo de la línea de pobreza y sufren otros tipos de estrés como el maltrato con una frecuencia reportada de 10 hasta 30% en niños de 6 a 9 años de edad por violencia intrafamiliar [74;75]. El Sistema Nacional para el Desarrollo Integral de la Familia (DIF) reporta que dentro de los casos de maltrato infantil que atiende, los más comunes son el maltrato físico, seguido del emocional, la falta de cuidados y la negligencia [75].

Debido a la relación existente entre el estrés en la infancia y el desarrollo de sobrepeso por incremento en el consumo de alimentos y a la evidencia en modelos animales como el de SM durante la lactancia, en el que también se observa dicho fenómeno [76;77], el estudio de los mecanismos moleculares que están alterados en estas condiciones es relevante, particularmente la funcionalidad del CRH-R2 en el hipotálamo por su papel en la inhibición del consumo de alimento en condiciones de estrés.

Dado que no se conoce la participación del CRH-R2 del NPV en la regulación del consumo de alimentos de ratas con SM es interesante definir si el incremento en la expresión del RNAm del CRH-R2 observado previamente [41], resulta de una disminución en su funcionalidad (probablemente provocada por cronicidad del estímulo de alguno de sus ligandos) y su posible relación con la hiperfagia de estos animales.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los animales sometidos a estrés por SM presentarán una funcionalidad disminuída del CRH-R2 en el NPV hipotalámico por su constante estimulación con los ligandos, lo que contribuye al desarrollo de su hiperfagia en la adultez.

#### **5. OBJETIVOS**

Definir la participación del receptor CRH-R2 del NPV en la regulación de la conducta alimentaria de ratas sometidas a estrés post-natal por SM y analizar la vía de señalización de CRH-R2 en estudios *in vitro*.

##### Específicos *in vivo*:

- 1.- Analizar el efecto de la SM sobre la expresión genética de los ligandos específicos de CRH-R2: Ucn2 y Ucn3 en el NPV de animales adultos comparada con la expresión de animales control.
- 2.- Identificar la posible internalización de CRH-R2 debida a la SM cuantificando la presencia de la proteína en la porción citosólica y membranal del NPV.
- 3.- Comparar la funcionalidad de CRH-R2 en ratas con SM vs. controles analizando el efecto de una administración intra-NPV de Ucn2 exógena en la conducta alimentaria, la concentración de AMPc y la fosforilación de CREB.

##### Específicos *in vitro*:

- 4.- Analizar la funcionalidad de CRH-R2 en una línea celular de neuronas hipotalámicas bajo diferentes tiempos de tratamiento con Ucn2.
- 5.- Identificar la fosforilación de AMPK y de CREB, así como la síntesis de péptidos relacionados con la conducta alimentaria a consecuencia de la activación de CRH-R2 en células hipotalámicas

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

Los experimentos realizados con animales sometiéndolos al modelo de separación materna y las determinaciones realizadas en las muestras de estas ratas fueron realizados en el Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz en la Ciudad de México (INPRF) bajo la tutoría de la Dra. Patricia de Gortari Gallardo. Los experimentos realizados en células en cultivo se llevaron a cabo durante una estancia de investigación en el laboratorio del Prof. Dimitris Grammatopoulos en la Universidad de Warwick en el Reino Unido.

### 6.1 Procedimiento experimental *in vivo*

Los experimentos realizados con animales fueron aprobados por el comité de ética del INPRF, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar provenientes del bioterio del INPRFM, las cuales permanecieron alojadas de manera individual en cajas de polipropileno durante todo el periodo experimental en condiciones de 12 h de luz y 12h de oscuridad (7:00/19:00 h) con agua y alimento estándar (Lab Rodent Diet 5001; PMI Feeds) *ad libitum*.

Se emplearon 30 ratas Wistar hembra gestantes; el día de nacimiento de las crías se consideró como el día 0 y en el día post-natal 2 se cuantificó el peso de todas las crías y se formaron los siguientes grupos con madres con un número similar de crías por camada:

Control 15 madres con 4 crías macho c/u aproximadamente. La única manipulación que recibió este grupo fue el cambio de aserrín una vez por semana (para evitar estrés adicional).

Separación materna (SM) conformado por 15 hembras con 4 crías macho c/u aproximadamente, sometidas a estrés post-natal, separando a la madre de su camada (colocándola en una caja individual en una habitación diferente a la de sus crías) durante 3 h/diarias del día 2 al 14, a diferentes horarios entre las 8:00 a.m. y las 2:00 p.m.

El día 22 post-natal los machos de ambos grupos fueron destetados y se colocaron en cajas individuales lo que permitió cuantificar su consumo de alimento. Se mantuvieron con agua y alimento estándar *ad libitum* durante las siguientes 7 semanas hasta alcanzar

la adultez (10 semanas de vida) y se registró su peso corporal y consumo de alimento semanalmente.

El día 71 post-natal se sacrificaron 12 animales/grupo, se extrajo el cerebro y se realizó la disección manual del NPV con un sacabocados de 1 mm de diámetro en una rebanada de cerebro de -1.08 a -3.24 mm a partir de bregma aproximadamente, siguiendo las coordenadas del Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson [78]. En 6 muestras de NPV por grupo se determinó la expresión del RNAm de los receptores CRH-R1, CRH-R2 y de los péptidos CRH, Ucn2 y Ucn3 por medio de PCR en tiempo real y en el resto de las muestras de NPV (6 animales/grupo) se cuantificó la expresión proteica de CRH-R2 en la porción citosólica y membranal celular por Western-Blot.

Al resto de los animales adultos (n=48/grupo aproximadamente) se les colocó una cánula intra-NPV una vez que su peso alcanzó  $290 \pm 10$  g. Siguiendo las coordenadas del Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson [78] (AP = -1.1 mm, L = 0.2 mm y DV = -7.2 mm con respecto a Bregma). Se utilizaron 100 mg/Kg de Ketamina (Anesket, PISA agropecuaria) y 10 mg/Kg de Xilacina (Procin, PISA agropecuaria) intramuscular para anestesiarse a los animales antes de colocarlos en el aparato estereotáxico. La cánula guía fue de 20-gauge (BD medical), implantada 3.2 mm arriba del NPV izquierdo evitando dañar la región hasta el día de la inyección.

Después de 4 días de recuperación se administraron 0.5  $\mu$ l de vehículo (sol. salina 0.9%) ó 0.7  $\mu$ g/0.5  $\mu$ l de Ucn2 (Sigma-Aldrich) con un catéter e inyector para llegar al NPV (-7.2 mm de bregma). Se administró el agonista específico Ucn2 ya que presenta un efecto anorexigénico 10 veces más potente que el de la Ucn3 la cual también es ligando específico para CRH-R2 [79], la dosis se eligió, basados en el efecto para disminuir el consumo de alimento que tiene una dosis similar de Ucn3 administrada intra-NPV [15].

Así se formaron 4 grupos:

- Control + Vehículo (n=24)
- Control + Ucn2 (n=24)
- SM + Vehículo (n=24)
- SM + Ucn2 (n=24)

En 10-11 animales/grupo se registró el consumo de alimento total 24 h después de la inyección. El resto de los animales (n=12/grupo) se sacrificaron 10 min después de la

inyección, se realizó la disección del NPV y se determinó la formación de AMPc por medio de un ensayo de inmunoadsorción asociado a enzimas (ELISA, ENZO Life Sciences) en 6 muestras/grupo y los niveles de la proteína CREB y de ésta misma en su forma fosforilada (P-CREB) por Western-Blot en 6-7 muestras/grupo.

## **6.2 Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)**

### *6.2.1 Extracción de RNA*

Para la determinación de la expresión genética, se llevó a cabo la extracción del RNA total del NPV por el método de Chomczynski-Sacchi [80].

Se homogenizaron las muestras por ultrasonido (vibra cell VC-130) en 100 µl de solución D (tiocinato de guanidina 4 M, citrato de sodio 25 mM pH 7, sarcosil 0.5%, β-mercaptoetanol 0.1 M).

Una vez homogeneizado el tejido, se agregaron 100 µl de fenol saturado con H<sub>2</sub>O tratada con dietil pirocarbonato (DEPC 0.1%); 10 µl de acetato de sodio 2 M -pH 4- y 30 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1. La mezcla se agitó con vórtex (Daigger Genie 2).

Las muestras se dejaron 15 minutos en hielo previo a su centrifugación durante 20 min a 4°C y 10,621 x g (Eppendorf Centrifuge 5417 R).

Se recuperó la fase acuosa de cada muestra a la que se agregaron 100 µl de isopropanol, se agitó y se dejó reposar a -20° C durante 24 h.

Posteriormente las muestras se centrifugaron a 20,227 x g a 4°C durante 30 min.

Se decantó el contenido y se agregaron 100 µl de etanol al 75%, se mezcló y centrifugó a 20,227 x g a 4°C por 8 min; se decantó el contenido y se repitió el procedimiento una vez más. Una vez decantado el etanol del último lavado y los tubos se secaron en un concentrador bajo vacío (Eppendorf Vacufuge) durante 5 min.

Para realizar la lectura de las muestras, el sedimento del NPV fue disuelto en 10 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC y se obtuvo la densidad óptica (D.O.) de 2 µl de la muestra con un fotómetro (Eppendorf Bio-photometer) a 230 nm para medir la cantidad de sales, a 260 nm para medir la cantidad de RNA y a 280 nm para medir la cantidad de proteínas. Las muestras que no tuvieron una relación mayor a 1.5 de la D.O. entre 260/230 y 260/280, se descartaron.

Se determinó la calidad de la extracción por medio de electroforesis con un gel de agarosa al 1.5 % determinando la integridad de la subunidades 28S y 18S del RNA



ribosomal (RNAr); la relación de la densidad de las dos bandas debió ser mayor a 1.5, de lo contrario, las muestras se descartaron.

En las muestras obtenidas del cultivo celular se realizó la extracción del RNA total siguiendo las instrucciones del kit GenElute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit, RTN70 (Sigma-Aldrich). Brevemente, posterior a los tratamientos con Ucn2 se removió el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS antes de añadir 250 µl de buffer de lisis a cada pozo, se dejó reposar durante 2 min y después se aspiró el contenido del pozo y se transfirió a un tubo con una columna de filtrado para remover residuos al centrifugar durante 2 min a 20,800 x g. A la solución filtrada se le añadieron 250 µl de etanol al 70%, se agitó la mezcla y se colocó en un tubo con columna de unión a RNA, el contenido fue centrifugado durante 15 s a 20,800 x g. Posteriormente la columna fue lavada 3 veces agregando 500 µl de solución de lavado y centrifugando a 20,800 x g por 15 s. Se obtuvo el RNA 50 µl de solución de elución y centrifugando a 20,800 x g durante 2 min.

Se determinó la concentración de RNA total de cada muestra con la lectura de 1 µl de muestra en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific).

### *6.2.2 Transcripción de RNA total a DNA complementario (DNAc)*

Las muestras de NPV (1.5 µg de RNA en 12 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC); se desnaturalizaron en baño maría a 65°C por 5 minutos; posteriormente se agregó la mezcla de transcripción (8.9 µl de H<sub>2</sub>O/DEPC, 6 µl de Buffer [Tris-HCl pH 7.5, 20 mM; NaCl 100 mM; EDTA 0.1 mM; DTT 1 mM; NP-40 0.01%; glicerol 50%] 3 µl de DTT (0.1 M), 0.6 µl de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP's 100 mM), 1 µl de poli dT (0.5 µg/µl) y 0.5 µl de M-MLV transcriptasa reversa (200 U/µl, Invitrogen). La mezcla se incubó 2 h a 37°C.

En las muestras obtenidas de las células en cultivo, se llevó a cabo la síntesis de DNAc con el kit TaqMan™ High Capacity RNA-to-cDNA 10704217 (Applied Biosystems). En cada tubo eppendorf de 0.2 ml se añadieron 1µg de RNA total de cada muestra y agua libre de nucleasas contenidos en 9 µl, 10 de Buffer y 1 µl de transcriptasa reversa. Los tubos fueron colocados en un termo-ciclador a 37° C por 60 min, 5 min a 95° C y 5 min a 4°C.

### 6.2.3 PCR en tiempo real

Se evaluó la concentración de RNAm específico para cada muestra por medio de PCR cuantitativa, utilizando reactivos y equipo de la marca Applied Biosystems en las muestras de NPV. Por cada muestra se agregaron a cada pozo 30ng de DNAc en 10 µl de H<sub>2</sub>O PCR + 6.25 µl de H<sub>2</sub>O PCR + 12.5 µl de Master-Mix + 1.25 µl de sonda taqman para CRH-R1 (Rn00578611\_m1), CRH-R2 (Rn00575617\_m1), CRH (Rn01462137), Ucn2 (Rn00591306\_s1), Ucn3 (Rn02091611\_s1) o β-actina (*Actb* 4352931E) como control. Las muestras se procesaron por duplicado al mismo tiempo que 3 curvas (1 para cada sonda) con 0, 3, 30 y 300ng de DNAc de muestras del grupo control, en 40 ciclos utilizando el sistema 7500. Para cada muestra, el ciclo umbral (Ct) se normalizó con el de β-actina ( $\Delta Ct = Ct \text{ del gen de interés} - Ct_{Actb}$ ). El cambio en la expresión de cada gen fue calculado con la fórmula:  $2^{-(\Delta Ct \text{ de cada grupo} - \Delta Ct \text{ del grupo Vehículo o Control})}$ . Los datos se expresaron como cambio total con respecto a la expresión del grupo control considerada con un valor de 1.

Con el DNAc obtenido de las muestras de cultivo celular, se determinó la expresión del RNAm utilizando el master-mix para PCR en tiempo real del kit SensiFAST SYBR Lo-ROX (Bioline, BIO-94005) y las siguientes secuencias de oligonucleótidos para los genes de interés (Tabla 2):

	<b>Secuencia Sentido</b>	<b>Secuencia Anti-sentido</b>
CRH-R2	CTGCATTACCGAATCGCCCTCA	CATTCTCAGGCAGCGGATACT
Neuropéptido Y (NPY)	TACTCCGCTCTGCGACTACA	GGCGTTTTCTGTGCTTTCCTTCA
Proteína relacionada al agouti (AgRP)	GCCTCAAGAAGACAACCTGCAGAC	AAGCAGGACTCGTGCAGCCTTA
Pro-opiomelanocortina (POMC)	CCATAGACGTGTGGAGCTGGTG	CATCTCCGTTGCCTGGAAACAC
Transcrito regulado por cocaína y amfetamina (CART)	TACTCTGCCGTGGATGATGCGT	TCGGAATGCGTTACTCTTGAGC
Neurotensina	GTGTGGACCTGCTTGTGAGA	TCCTTTGCTGACCTTCGATG
Proteína de unión a la caja TATA (TATABP)	AGTGCATACTTATCACCAAGCA	CCACTTGTACGAACTGGGTTTT

**Tabla 2.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados para la cuantificación de la expresión del RNAm de CRH-R2, péptidos relacionados con la conducta alimentaria y el gen de expresión constitutiva TATABP por PCR en tiempo real.

La reacción fue llevada a cabo y analizada en un equipo para PCR-tiempo real Applied Biosystems fast 7500. Para cada muestra, el Ct se normalizó con el de TATABP ( $\Delta Ct = Ct \text{ del gen de interés} - Ct \text{ de TATABP}$ ) y el cambio en la expresión de cada gen fue

calculada también con la fórmula:  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ . Los datos se expresaron como cambio total con respecto a la expresión del grupo control considerada con un valor de 1.

### **6.3 Inmunodetección con la técnica de Western Blot**

#### *6.3.1 Extracción de proteínas*

Para realizar la extracción de proteínas, cada NPV fue homogenizado en 100  $\mu$ l de buffer EDTA pH 8 (TrisHCl 50 mM, EDTA 50 mM, SDS 1% y NaCl 50mM), con sacarosa al 10%, inhibidor de proteasas (complete mini, Roche) y de fosfatasas (PhosSTOP, Roche) para la obtención de la fracción citosólica.

Las muestras se incubaron durante 25 min a 4° C antes de ser centrifugadas a 15,300 x g durante 60 min a 4°C. 1  $\mu$ l del sobrenadante, se diluyó con 99  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O desionizada para determinar el contenido de proteínas por el método de Lowry [81]. Se extrajeron 95  $\mu$ l del sobrenadante (fracción citosólica) a los que se agregó el mismo volumen de buffer Laemmli 2X (Tris 0.5M pH 6.8, SDS 10%, glicerol 20%, mercaptoetanol 10% y 0.1% de azul de bromofenol).

El precipitado se homogenizó con 50  $\mu$ l de buffer EDTA con deoxicolato de Na 1% (Sigma-Aldrich), inhibidor de proteasas y Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich) para la extracción de proteínas en la fracción membranal.

Se incubaron las muestras a 4°C en agitación, durante 60 min previamente a ser centrifugadas a 12000 rpm durante 60 min a 4°C. En 1  $\mu$ l del sobrenadante se determinó el contenido de proteínas y se extrajeron 45  $\mu$ l del sobrenadante (fracción membranal) a los que se agregó el mismo volumen de buffer Laemmli 2X.

Las muestras de ambas fracciones (citosólica y membranal) fueron desnaturalizadas en baño maría a 100°C durante 4 min y después se centrifugaron a 13,800 rpm durante 10 min a 4°C.

#### *6.3.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida*

Se utilizó el equipo mini-protean (BIO-RAD) para el procesamiento y transferencia de proteínas del gel a la membrana.

Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10% preparados según la hoja técnica (Solutions for Tris/Glycine SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, BIO-RAD).

20 ó 30  $\mu\text{g}$  de proteína/muestra se utilizaron para la detección de CRH-R2 y  $\beta$ -actina o CREB fosforilado (P-CREB) y CREB total respectivamente, ajustando el volumen final de carga a 20  $\mu\text{l}$  con buffer Laemmli 1X. Se utilizó el marcador de peso molecular (Prestained SDS-PAGE Standards, broad range, BIO-RAD). Los geles se procesaron con un voltaje para la electroforesis de 130 V por 90 min. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Life Science) con 0.18 A durante 90 min a 4 °C.

### *6.3.3 Inmunodetección*

Las membranas fueron colocadas en solución bloqueadora de albúmina bovina al 5% (Sigma-Aldrich) durante 60 min en agitación, antes de ser incubadas durante 48 h con los anticuerpos primarios de: CRH-R2 (1:200, abcam 75168), CREB (1:200, Santa Cruz Biotechnology 25785), P-CREB (1:200, Ser 133, Santa Cruz Biotechnology 7978), actina (1:200, Santa Cruz Biotechnology 1616) o la 5' nucleotidasa (1:100, Santa Cruz Biotechnology 14682) como proteínas constitutivas del citosol o la membrana celular respectivamente.

Se realizaron 4 lavados con PBS 1X/Tween 0.05%: el primero con agitación rápida durante 10 min y los demás por 15 min con agitación moderada. Las membranas se incubaron durante 1 h con los anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa de rábano (HRP) anti-conejo (1:2000, abcam 6721) para CRH-R2, CREB y P-CREB o anti-cabra (1:2000, Santa Cruz Biotechnology 2378) para  $\beta$ -actina y la 5' nucleotidasa.

### *6.3.4 Revelado y análisis de imagen*

Se realizaron 4 lavados con PBS 1X/Tween 0.05% y se agregó 1 ml de la mezcla de solución A + solución B del reactivo para quimioluminiscencia luminol (Santa Cruz Biotechnology), antes de exponer las membranas a una placa de revelado (Scientific Imaging Films, Kodak BIOMAX), que fue sumergida en solución reveladora y fijadora (Kodak). Se obtuvieron las imágenes de estas placas capturadas con una cámara de fotografía digital para analizar las D.O. de las bandas con el software Image J (National

Institutes of Health). Los resultados se presentan como porcentaje de la expresión del grupo SM vs el grupo control (100%) o porcentaje de los diferentes grupos inyectados vs el grupo control-veh (100%).

### *6.3.5 Western Blot de muestras de cultivo celular*

Para la extracción de proteínas totales de la línea celular, se utilizó un buffer de lisis SDS 2% [SDS 2% + Tris-HCl 0.1M + ditiotreitolo (DTT) 0.1 M, 10% de inhibidores de proteasas y 10% de inhibidores de fosfatasa (Halt Thermo Fisher Scientific)] y se determinó la cantidad de proteínas con un kit de ensayo colorimétrico (Pierce BCA 23225, Thermo Fisher Scientific).

Se siguieron pasos similares a los descritos anteriormente para la desnaturalización de las proteínas, la electroforesis, y la transferencia a membranas de nitrocelulosa.

Después, se utilizaron los anticuerpos primarios para CRH-R2 (1:1000, abcam 203585),  $\beta$ -actina (1:1000, cell signalling cs4970), AMPK fosforilada (1:1000, Thr 172, cell signalling cs25355), AMPK total (1:1000, cell signalling cs2532), CREB fosforilado (1:500, Ser 133, cell signalling cs8763) y CREB total (1:500, cell signalling csD76D11) para la inmunodetección de proteínas de interés y el anticuerpo secundario (1:10000, anti-conejo DyLight 800 cs5151P) para la visualización de las bandas con el equipo Odyssey (LI-COR Biosciences) y el software Image Studio (LI-COR Biosciences). Las bandas se analizaron con el software Image J y los resultados se presentan como porcentaje de la expresión de las células tratadas con Ucn2 vs las células no tratadas (100%).

### **6.4 Tinción de Nissl en tejido cerebral**

Para determinar la trayectoria de la cánula guía y la inyección en el NPV se realizaron cortes de 30  $\mu$ m en un cerebro escogido al azar de cada grupo de animales inyectados con vehículo o Ucn2 y sacrificados 24 h después de la inyección para analizar la trayectoria de la cánula guía y la inyección en el NPV.

Los cortes de -1.08 a -2.28 mm a partir de bregma fueron realizados en un criostato (Microm HM 525, Carl Zeiss IMT Corporation), colocados en porta-objetos y secados con aire frío para eliminar el exceso de humedad.

Los tejidos fueron fijados con paraformaldehído (Sigma-Aldrich) al 4% durante 20 min. Después de 3 lavados con PBS 1X; se colocaron en soluciones de 100, 95, 70 y 50% de etanol-agua desionizada 3 min cada uno y se llevó a cabo la tinción de Nissl para ácidos

nucleicos utilizando una solución 0.1% de violeta de cresilo (Sigma-Aldrich) durante 20 min [82]. Se realizaron otros lavados con etanol-agua deionizada en concentraciones crecientes 50, 70, 95 y 100% durante 1 min. Por último se agregó xileno 100% (Sigma-Aldrich) para aclarar el tejido y se colocaron los cubreobjetos con medio de montaje Entellan (Merck).

### **6.5 Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)**

Se utilizó el kit de ELISA (ENZO, ADI-900-163) para determinar el contenido de AMPc en el NPV de animales administrados con Ucn2. Los NPVs se homogenizaron con 150  $\mu$ l de HCL 0.1M y centrifugaron a 2 600 rpm durante 10 min a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se agregó HCL 0.1M hasta obtener un volumen total de 211 $\mu$ l; se mezcló y se tomaron 11 $\mu$ l para determinación de proteínas por el método de Lowry [81]. Al resto de la mezcla se agregaron 10  $\mu$ l de mezcla de acetilación (1:3, trietilamina: anhídrido acético). Se siguieron las instrucciones del fabricante y se leyó la placa a 405 nm en un lector para placas de ELISA (BioTek). Límite de detección: 0.78 pmol/mL; variación inter e intra-ensayo: 10.7 y 6.5 %, respectivamente.

### **6.6 Procedimiento experimental *in vitro***

Para monitorizar la desensibilización homóloga del receptor CRH-R2 con Ucn2 y las vías de señalización activadas con este estímulo, se utilizó una línea celular de neuronas hipotalámicas inmortalizadas, procedentes de ratones macho C57B1/6 adultos (mHypoA-2/30) (Cellutions Biosystems Inc) [83].

Las células fueron cultivadas en Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 4500 mg/L de glucosa (D5796, Sigma-Aldrich), 10% de suero fetal bovino (ATCC30) y 1% de penicilina/streptomycin (Biochrome AG, A2213). Se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub> (Hera cell 150, Thermo Scientific).

Cuando las células tuvieron una confluencia de 80-90% se aplicaron estímulos de 100 nM de Ucn2 (Bachem) para la activación del receptor CRH-R2. Ésta es una concentración efectiva para la fosforilación de CREB de acuerdo a estudios previos [48;84].

### **6.7 Microscopia Confocal**

Para determinar la localización del receptor CRH-R2 en las células mHypoA-2/30 sin tratamiento o a diferentes tiempos después de su estimulación con Ucn2, las células se cultivaron durante 24 h en cubreobjetos esterilizados y tratados con poli-D-lisina

(100µg/ml en PBS). Se trataron con 100 nM de Ucn2 durante 1, 2 ó 4 horas antes de remover el medio de cultivo. Se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min. Después de 3 lavados con PBS 1X se bloqueó la unión no específica del anticuerpo con una solución de albúmina sérica bovina al 3% y tritón X-100 al 0.01% en PBS para permeabilizar la membrana durante 1 h. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario CRH-R2 (abcam 203585) concentración 1:50 en 1% BSA durante 18 h. Después de 3 lavados con PBS se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) 1:1000 en BSA 1% durante 1 h. Después de 3 lavados con PBS 1X se fijaron nuevamente las células con paraformaldehído al 4% por 10 min y se agregó el marcador de núcleo celular DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole 1µg/ml) durante 10 min, se removió dicha solución y después de 3 lavados con PBS 1X se dejaron secar los cubreobjetos y se colocaron en portaobjetos con medio de montaje Vectashield (Vector laboratories). Las células se visualizaron en el microscopio confocal (Zeiss laser scanning microscope 710).

## **6.8 Análisis estadístico**

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas para comparar cambios en el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal a lo largo del experimento entre animales SM y control. Los cambios entre los dos grupos en la expresión proteica de CRH-R2 y genética de CRH-R1, CRH-R2, CRH, Ucn2 y Ucn3 fueron analizados con prueba *t* de Student; se realizaron ANOVAs de 2 vías para evaluar cambios en el consumo de alimento, la formación de AMPc y la expresión de P-CREB/CREB derivados de la administración de Ucn2 en el NPV de adultos con y sin SM, comparando grupos y tratamiento y ANOVAs de 1 vía para analizar cambios en la expresión de proteínas fosforiladas, el receptor CRH-R2 y el RNAm de péptidos relacionados con la conducta alimentaria a diferentes tiempos después de la estimulación de CRH-R2 en las células en cultivo. Se utilizó en software Stat-View (SAS Institute Inc.). Cuando el ANOVA factorial fue significativo ( $P < 0.05$ ) se realizaron pruebas post-hoc de Fisher.

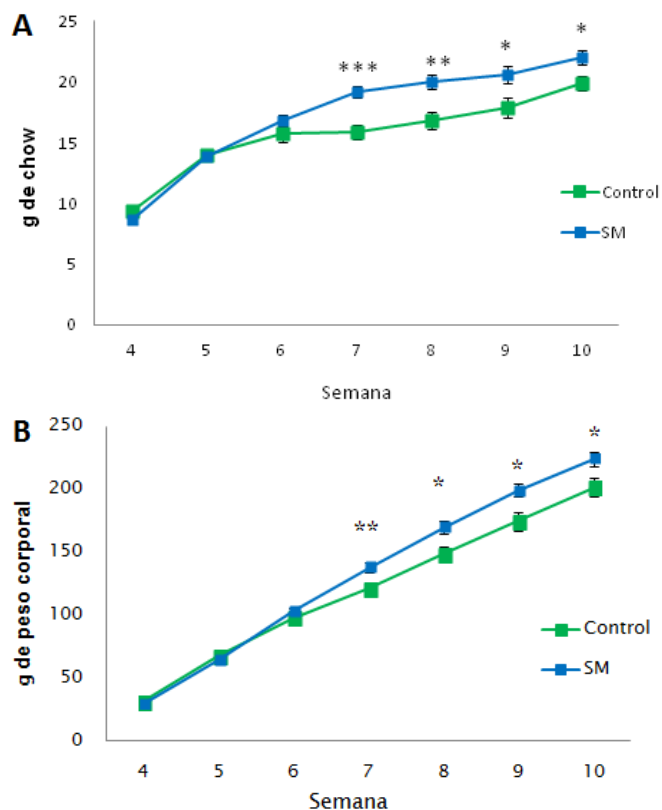
## 7. RESULTADOS

### Resultados de experimentos *in vivo*

Todos los resultados obtenidos con el modelo de SM ya fueron publicados [85]. Se anexa el artículo al final de la tesis (Anexo 1).

#### 7.1 Consumo de alimento y ganancia de peso corporal

El consumo de alimento del grupo con SM incrementó 13.9% en promedio a lo largo del tiempo de experimentación con respecto al control (=100% 19.24 g de chow); el ANOVA de medidas repetidas mostró efecto del grupo  $F_{(1,176)} = 8.32$   $P < 0.01$  y del tiempo  $F_{(1,4)} = 51.903$   $P < 0.0001$  (Figura 3A). Los animales con SM también presentaron una ganancia de peso corporal 13.3% mayor que la de los controles (=100% 179g de peso ganados) a partir de la semana 7 que se mantuvo hasta el final del experimento; el ANOVA de medidas repetidas mostró efecto del grupo  $F_{(1,192)} = 4.972$   $P < 0.05$ , del tiempo  $F_{(1,4)} = 635.44$   $P < 0.0001$  e interacción entre las variables  $F_{(1,4)} = 4.458$   $P < 0.05$  (Figura 3B).

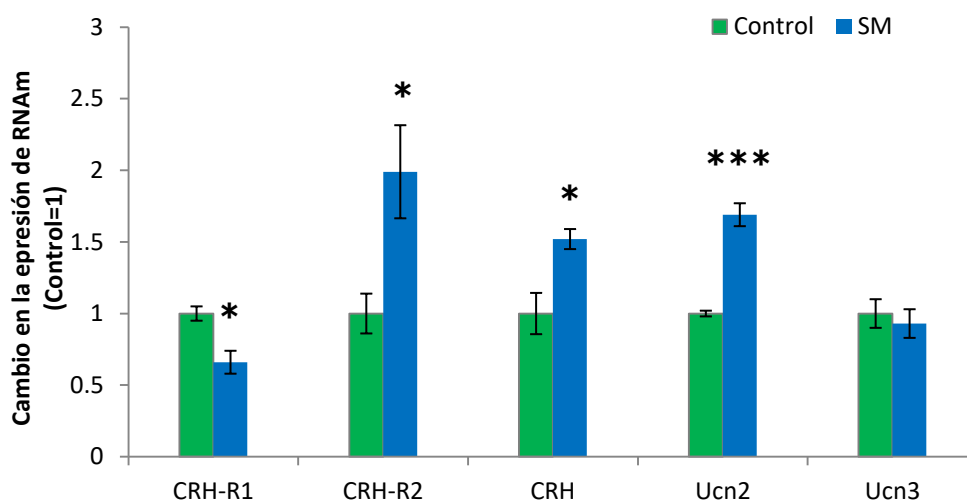


**Figura 3.** El panel A muestra los gramos de alimento diarios consumidos por cada rata en cada semana. El panel B los gramos de peso corporal ganados cada semana con respecto al peso de cada animal en la semana 3 (destete). Se representa el promedio  $\pm$  EEM ( $n=25$ /grupo). \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  y \*\*\* $P < 0.001$  vs control.



## 7.2 Expresión genética del sistema de CRH en el NPV

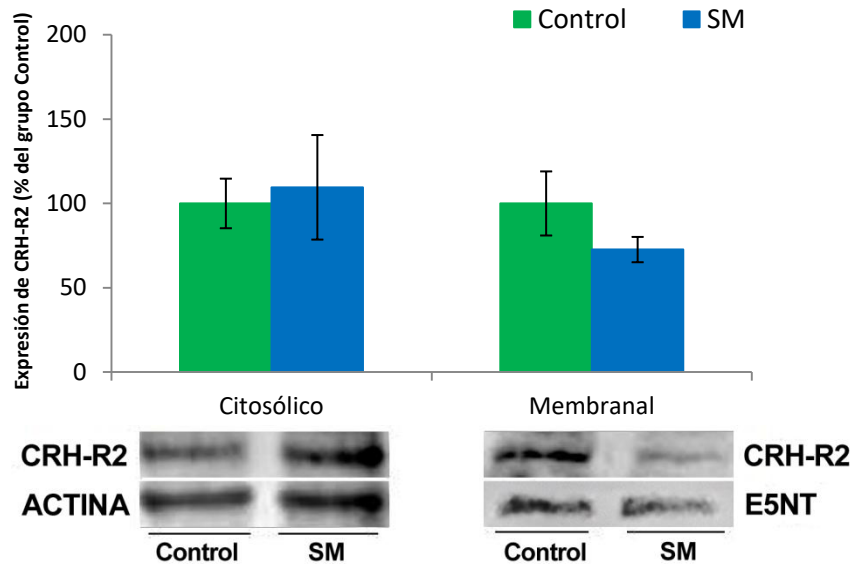
De igual manera la expresión de los RNAm del receptor CRH-R2 y de la hormona CRH en el NPV incrementó 99% y 52% respectivamente en los animales con SM contra la de los controles (=100%;  $t=-2.801$   $P<0.05$  para CRH-R2,  $t=-3.045$   $P<0.05$  para CRH)(Figura 4). En cambio la expresión del receptor CRH-R1 fue 34% menor en los animales con SM comparados con sus controles (=100%;  $t=3.279$   $P<0.05$ ). Al analizar la expresión de las Ucn observamos un incremento de 69% en la expresión de Ucn2 en el grupo con SM ( $t=-7.169$   $P<0.001$ ) y niveles de RNAm de Ucn3 similares a los del grupo control (=100%) (Figura 4).



**Figura 4.** Los valores son el promedio del resultado de la ecuación  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizando la expresión del RNAm de cada gen de interés con la de  $\beta$ -actina. Se representa el promedio  $\pm$  EEM usando la expresión del grupo control con un valor de 1 (n=5/grupo). \*  $P<0.05$  vs Control, \*\*\*  $P<0.001$  vs Control.

### 7.3 Expresión de la proteína CRH-R2 en la fracción citosólica y membranal del NPV

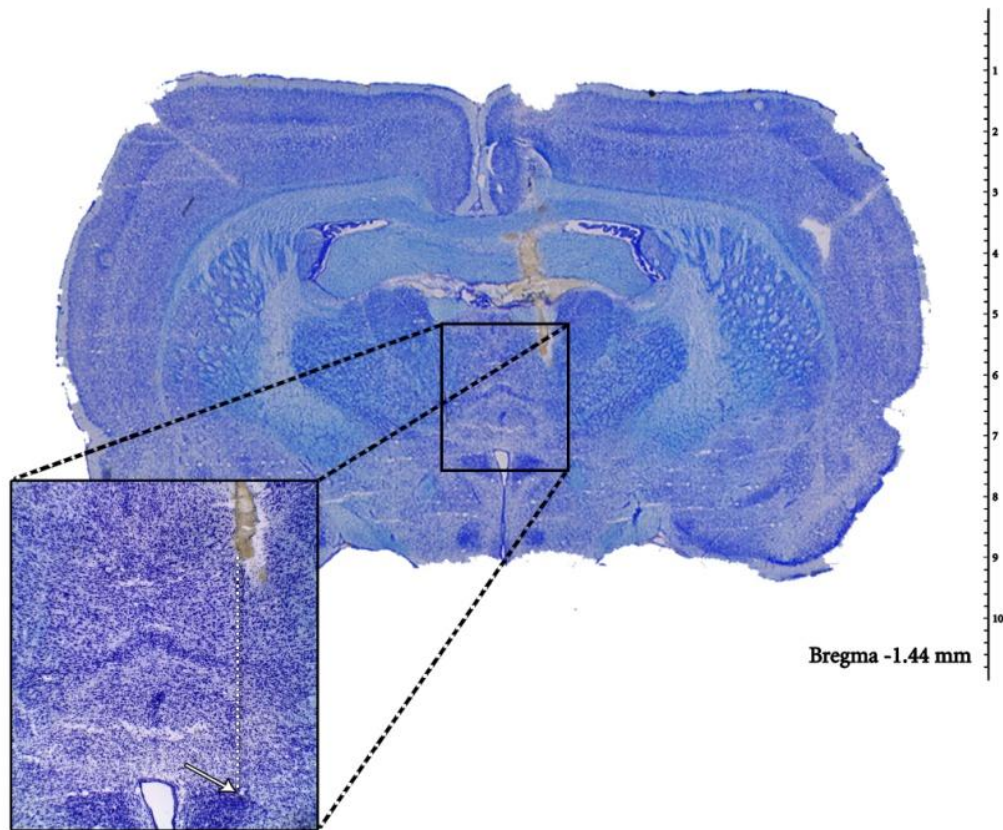
El contenido de la proteína CRH-R2 en la porción membranal y citosólica no fue diferente entre las ratas control y con SM, sin embargo los niveles de proteína en la porción membranal tuvo una tendencia a disminuir (Figura 5).



**Figura 5.** Expresión proteica de CRH-R2 en las porciones membranal y citosólica de animales adultos control (100%) y con SM. Se presenta el promedio  $\pm$  EEM. Resultados normalizados con la expresión de actina en el citosol o 5'nucleotidasa en la membrana celular (n=6/grupo).

#### 7.4 Comprobación de la trayectoria de la cánula al NPV

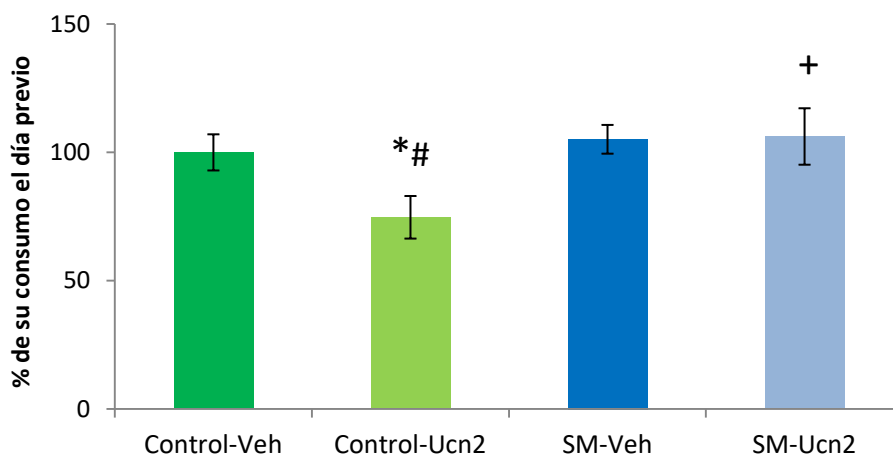
Se examinaron 4 cerebros de animales inyectados con vehículo o Ucn2 en el NPV para determinar la posición y trayectoria de la cánula y del inyector hacia el NPV. En la figura 6 se observa el corte de uno de estos cerebros teñido con violeta de cresilo, comprobando la trayectoria de la cánula a la altura del NPV en su segmento medial (Figura 6).



**Figura 6.** La imagen es una muestra de los cerebros en los que se analizó la trayectoria de la cánula hacia el NPV utilizando la tinción de Nissl para observar las estructuras cerebrales a la altura del NPV medial de acuerdo al Atlas de cerebro de rata de Paxinos y Watson [78].

## 7.5 Consumo de Alimento de las ratas administradas con vehículo o Ucn2

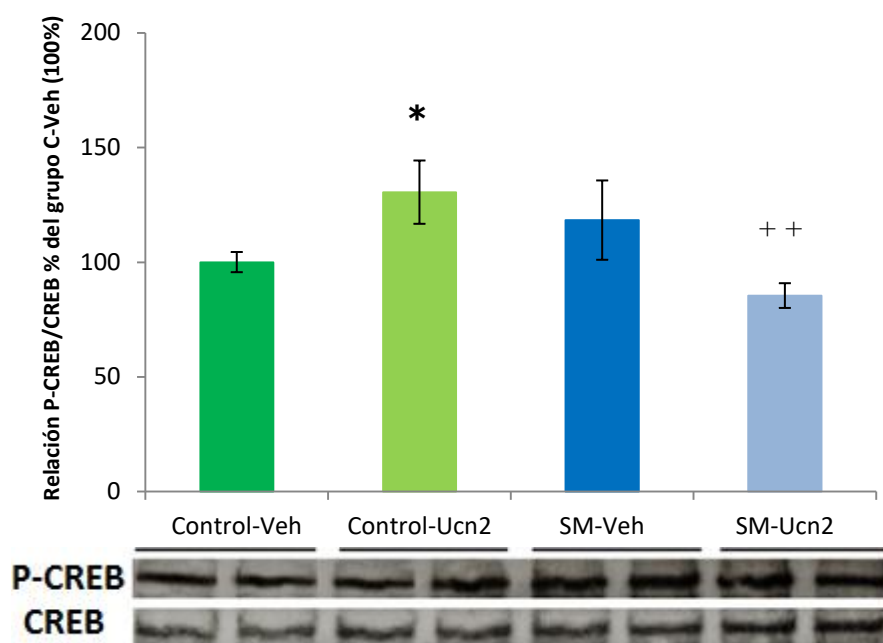
Las ratas control con administración de Ucn2 intra-NPV disminuyeron significativamente su consumo de alimento comparándolo con el consumo de aquéllas administradas con vehículo, mientras que no se observaron diferencias significativas en el consumo de alimento entre ratas con SM administradas con vehículo o Ucn2. El ANOVA de 2 vías mostró diferencias significativas entre grupos  $F_{(1,39)} = 5.121$   $P < 0.05$  (Figura 7).



**Figura 7.** Consumo de alimento total durante las 24 h posteriores a la administración de vehículo o 0.5  $\mu\text{g}$  de Ucn2 intra-NPV en ratas adultas control y con SM. Se representa el porcentaje de consumo en 24 h comparado con el consumo previo de cada rata (100%). Promedios  $\pm$  EEM (n=11/grupo). \*  $P < 0.05$  vs Control-Veh, #  $P < 0.05$  vs SM-Veh, +  $P < 0.05$  vs Control-Ucn2.

## 7.6 Fosforilación de CREB después de la inyección de Ucn2 o vehículo en el NPV de ratas control y con SM

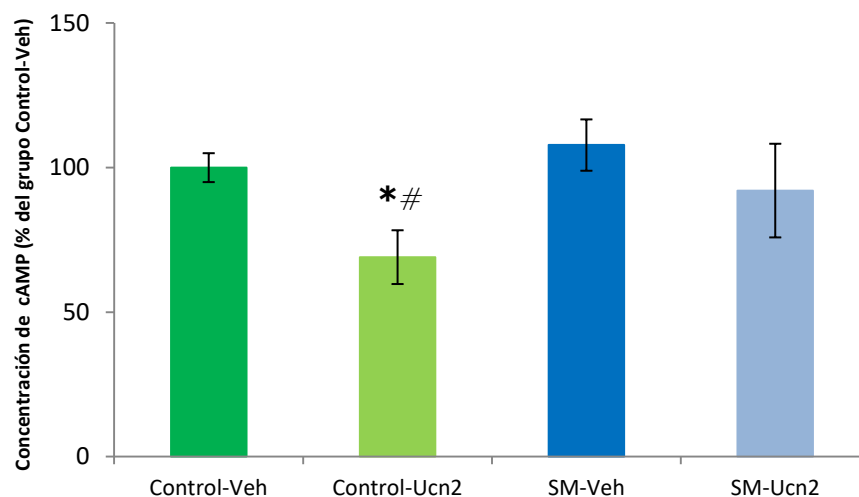
La fosforilación de la proteína CREB en animales adultos, administrados con Ucn2 y sacrificados 10 minutos después se incrementó únicamente en ratas control (Control-Ucn2), mientras que en animales con SM administrados con el agonista (SM-Ucn2) no hubo incremento en la relación P-CREB/CREB con respecto a los grupos inyectados con vehículo (Control-Veh, SM-Veh). El ANOVA de 2 vías mostró diferencia significativa entre grupos  $F_{(1,22)} = 9.198$   $P < 0.01$  (Figura 8).



**Figura 8.** Relación entre la expresión de la proteína CREB en su forma fosforilada (P-CREB Ser-133) y total (CREB) 10 minutos después de las inyecciones intra-NPV de vehículo o Ucn2. Se representa el promedio  $\pm$  EEM en porcentaje con respecto al grupo Control-Veh ( $n=6$ /grupo). \*  $P < 0.05$  vs Control-Veh, ++  $P < 0.01$  vs Control-Ucn2

### 7.7 Concentración de AMPc después de la inyección de vehículo o Ucn2 en el NPV

El contenido de AMPc en el NPV disminuyó en ratas control administradas con Ucn2 (Control-Ucn2) 10 minutos antes del sacrificio, comparado con el contenido de ratas control (94.93 pmol/mg de proteína=100%) y SM inyectadas con vehículo (Control-Veh, SM-Veh). El ANOVA de 2 vías mostró diferencias entre tratamientos  $F_{(1,17)} = 4.133$   $P < 0.05$  (Figura 9).

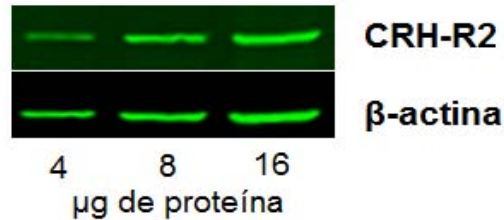


**Figura 9.** Concentración de AMPc (pmol/mg de proteína) en el NPV 10 minutos después de la administración de vehículo o Ucn2 en ratas control o con SM. Se representa la concentración de AMPc en el tejido cerebral en porcentaje con respecto al grupo C-Veh (100%). Promedio  $\pm$  EEM (n=5/grupo). \*  $P < 0.05$  vs Control-Veh, #  $P < 0.05$  vs SM-Veh.

## Resultados de experimentos *in vitro*

### 7.8 Expresión de CRH-R2 en la línea celular mHypoA-2/30

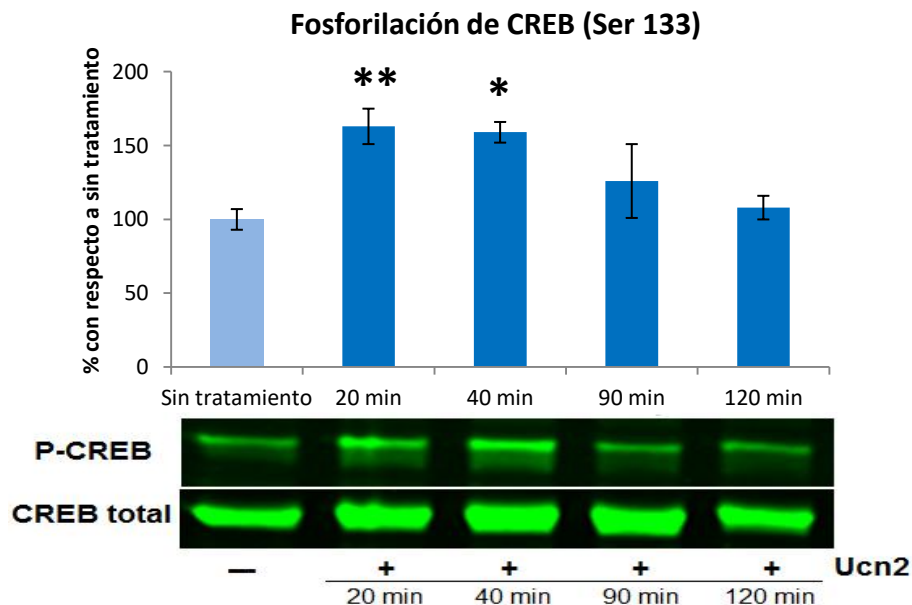
Verificación de la presencia del CRH-R2 en la línea celular de neuronas hipotálamicas de ratón adulto mHypoA-2/30. Utilizando diferentes concentraciones de proteína (4, 8 y 16  $\mu\text{g}$ ) se determinó la presencia del receptor CRH-R2 y la unión del anticuerpo en la línea celular mHypoA-2/30 (Figura 10).



**Figura 10.** Expresión de CRH-R2 en mHypoA-2/30. Se muestra el incremento en la intensidad de la señal fluorescente de CRH-R2 y de  $\beta$ -actina conforme se incrementó la concentración de proteína.

### 7.9 Fosforilación de CREB con la adición de Ucn2

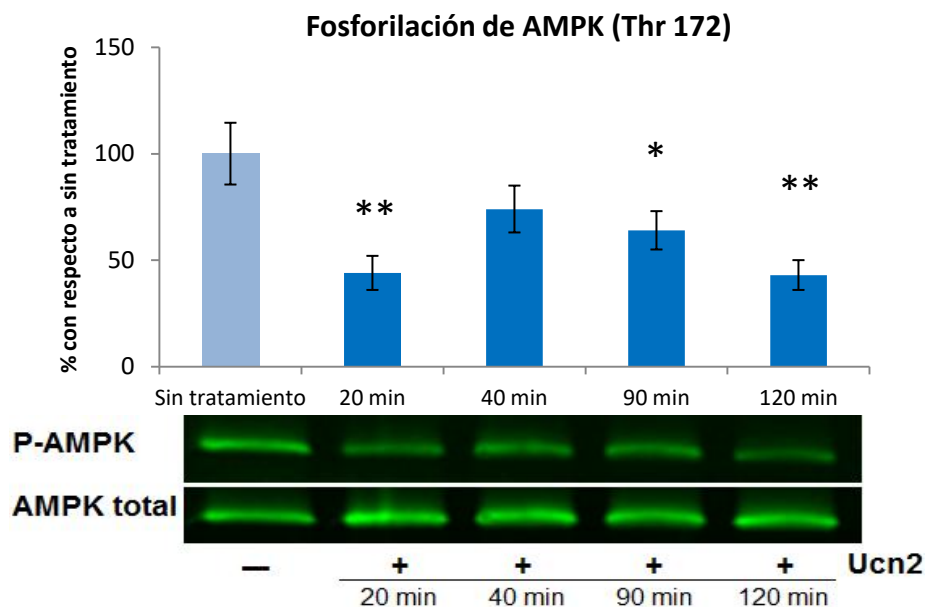
Comprobación de la funcionalidad de CRH-R2 en la línea celular mHypoA-2/30. Estimulando las células con Ucn2 100nM se determinó el incremento en la fosforilación de CREB a los 20 y 40 min como marcador de la activación de la vía de segundos mensajeros intracelulares conocida para este receptor. El ANOVA de una vía mostró efecto del tratamiento  $F_{(4,13)} = 3.597$   $P < 0.05$  (Figura 11).



**Figura 11.** Incremento en la fosforilación de la proteína CREB después de la administración de Ucn2 a las células mHypoA-2/30. Se representa el porcentaje con respecto a la relación P-CREB/CREB total en las células no tratadas (100%). Promedio  $\pm$  EEM ( $n=4$  pozos/grupo). \*  $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs sin tratamiento.

### 7.10 Fosforilación de AMPK con la adición de Ucn2

Estimulando las células mHypoA-2/30 con 100nM de Ucn2 se evaluó el cambio en la fosforilación de AMPK y se observó que la Ucn2 provocó una inhibición de la fosforilación, lo que se relaciona con su inhibición en su actividad a los 20, 90 y 120 min de tratamiento. El ANOVA de una vía mostró efecto del tratamiento  $F_{(4,13)} = 4.978$   $P < 0.05$  (Figura 12).

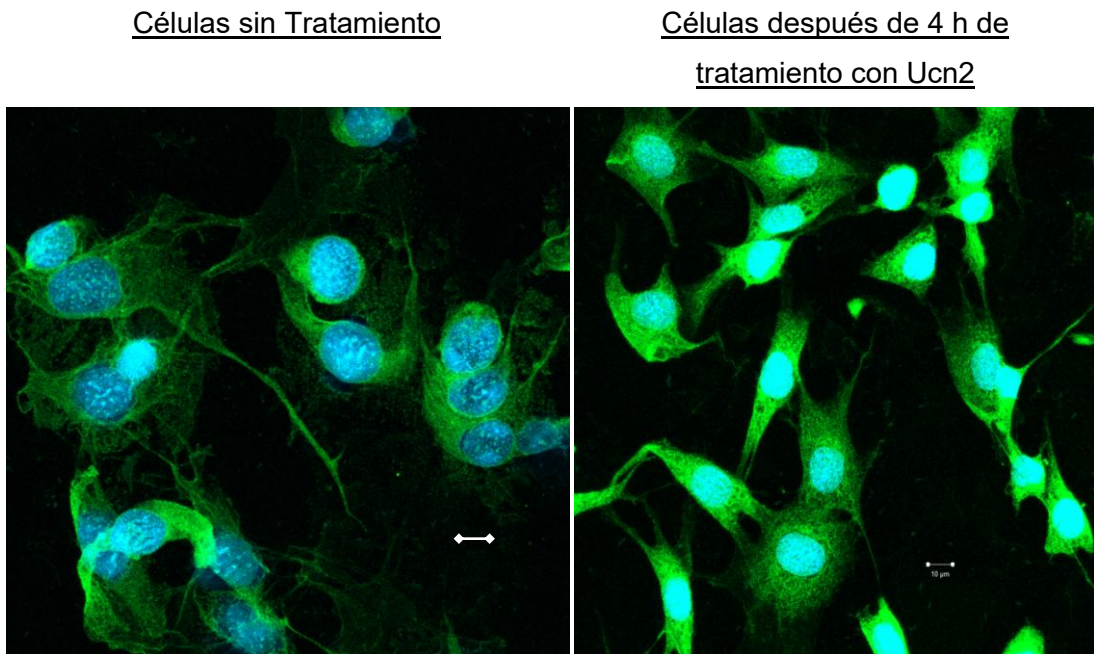


**Figura 12.** Inhibición en la fosforilación de la enzima AMPK después de la administración de Ucn2 en las células mHypoA-2/30. Se representa el porcentaje con respecto a la relación P-AMPK/AMPK total en las células no tratadas (100%). Promedio  $\pm$  EEM (n=4 pozos/grupo). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs sin tratamiento

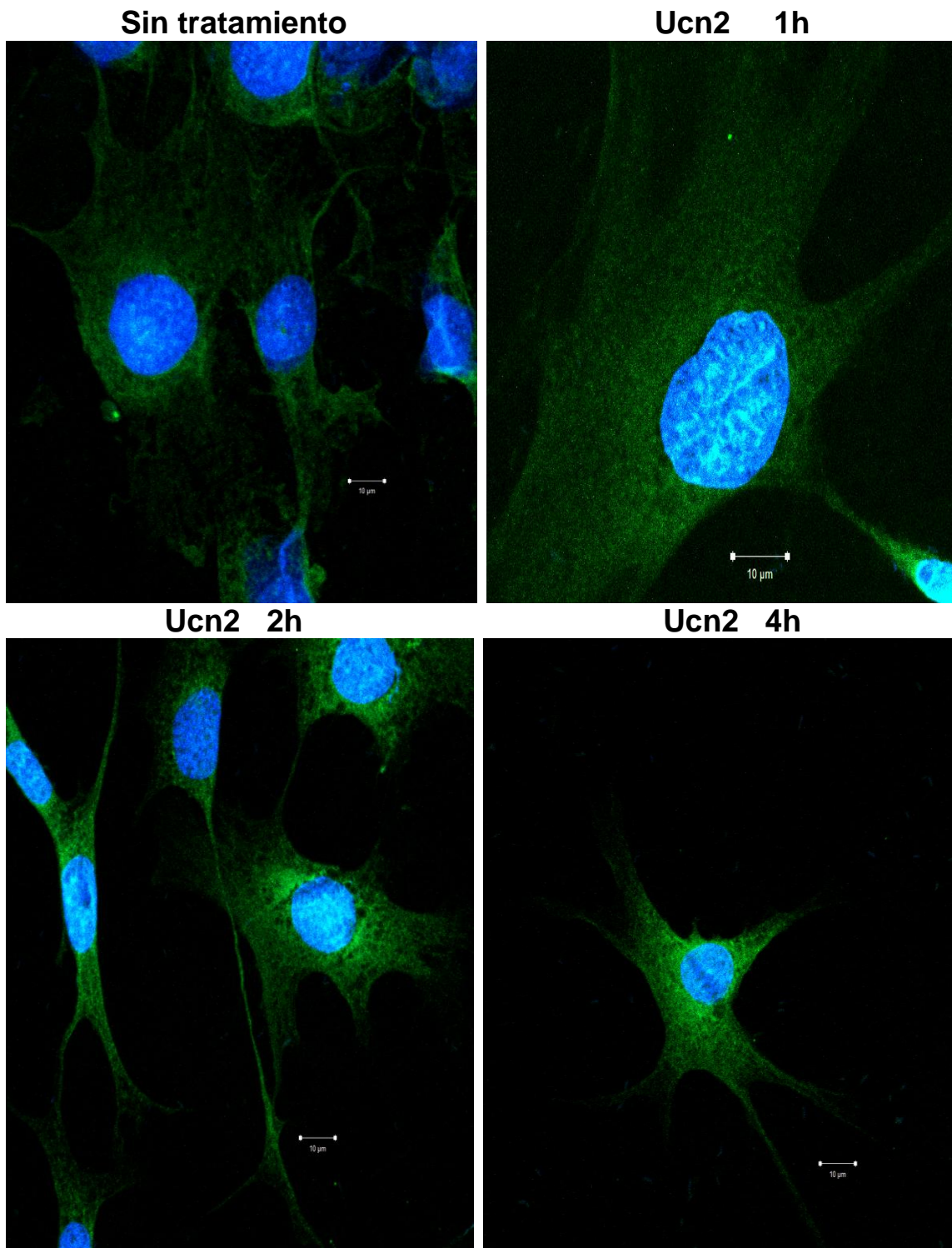


### 7.11 Distribución intracelular de CRH-R2 después de su estimulación con Ucn2

Determinación de la localización del receptor CRH-R2 en células con y sin tratamiento de Ucn2 a diferentes tiempos por medio de microscopía confocal. La figura 13 muestra el incremento en la intensidad de la señal verde (CRH-R2, anticuerpo secundario FITC) después de 4 h de tratamiento con Ucn2. En la figura 14 se puede apreciar que el receptor se concentra en una región peri-nuclear conforme pasa el tiempo.



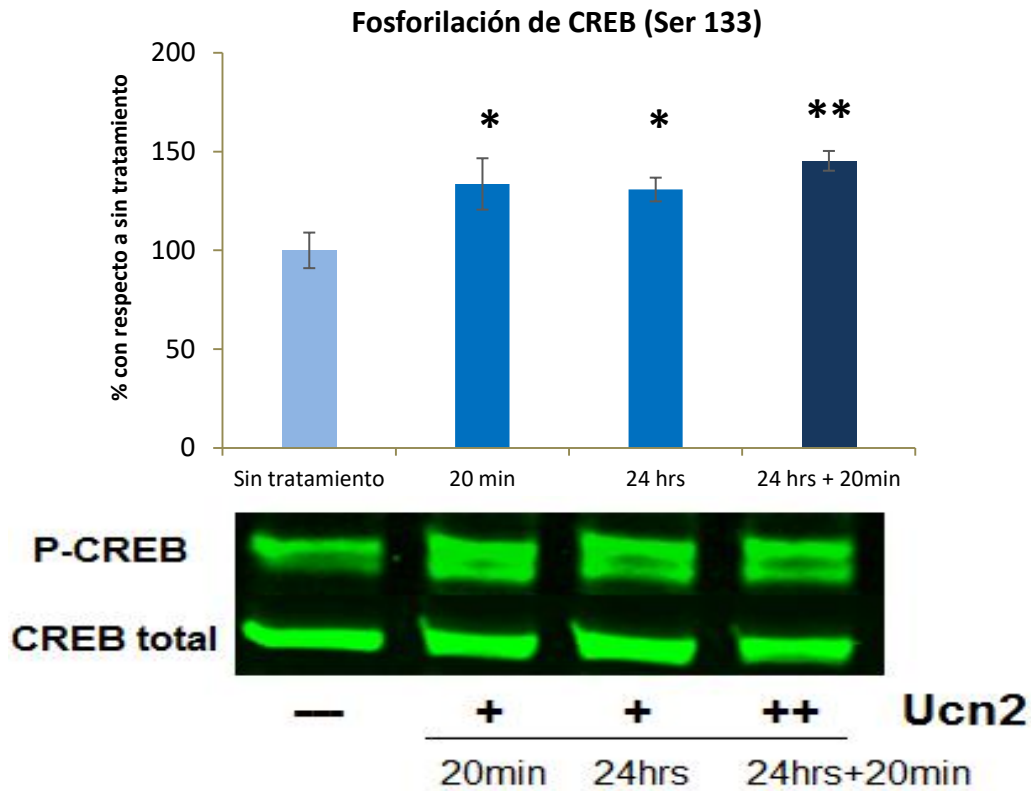
**Figura 13.** Se muestra el efecto de la Ucn2 sobre la localización del CRH-R2 (Verde) en células sin tratamiento o después de 4 h de estimulación. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul).



**Figura 14** Se observa el efecto de la Ucn2 sobre la localización del CRH-R2 (Verde) en células sin tratamiento o después de 1, 2 ó 4 h de estimulación. Los núcleos celulares se marcaron con DAPI (azul).

### 7.12 Efecto de un tratamiento prolongado con Ucn2 sobre la fosforilación de CREB

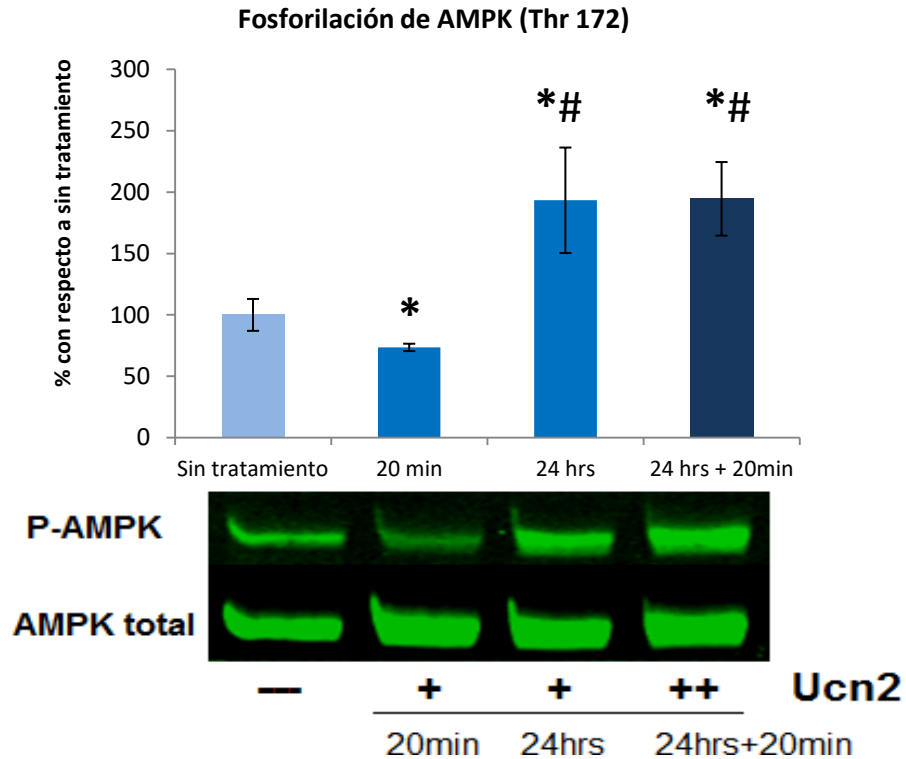
La fosforilación de la proteína CREB incrementó con una administración de Ucn2 100 nM a los 20 min, a las 24 h se mantuvo fosforilado con una segunda administración del ligando a la misma concentración después de 24h (estímulación crónica de CRH-R2). El ANOVA de una vía mostró efecto del tratamiento  $F_{(3,13)} = 3.656$ ,  $P < 0.05$  (Figura 15).



**Figura 15.** Fosforilación de CREB a consecuencia al tratamiento de Ucn2 sencillo y doble, comparado con las células no tratadas. Se representa la expresión de la proteína fosforilada normalizada con la de proteína total. Promedio  $\pm$  EEM (n=4-5 pozos/grupo). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs sin tratamiento.

### 7.13 Efecto de un tratamiento prolongado con Ucn2 sobre la fosforilación de AMPK

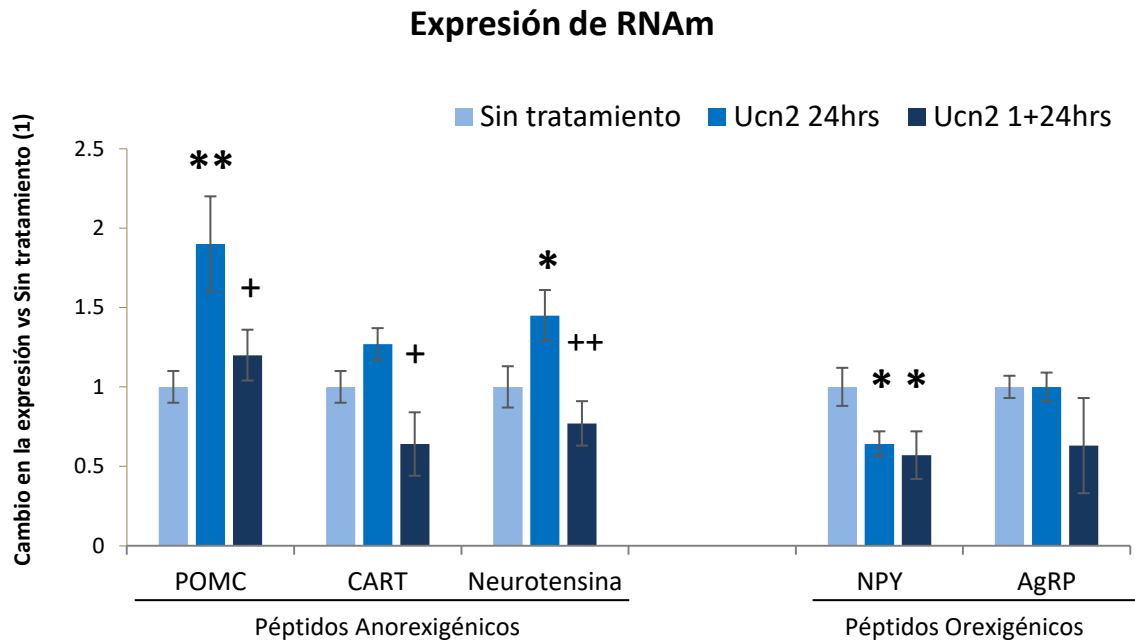
El tratamiento agudo con Ucn2 disminuyó la fosforilación de AMPK en las células mHypoA-2/30 a los 20 min, sin embargo el tratamiento de 24 h incrementó la fosforilación de la enzima y el efecto inhibitorio de la Ucn2 se bloqueó en las células tratadas con un segundo estímulo de Ucn2 después de 24 h. El ANOVA de una vía mostró efecto del tratamiento  $F_{(3,12)} = 5.436$   $P < 0.05$  (Figura 16).



**Figura 16.** Inhibición y activación de la fosforilación de AMPK en consecuencia al tratamiento de Ucn2 por 20 min o 24 h respectivamente. Un segundo estímulo después de 24 h no inhibió la fosforilación de AMPK. Se representa la expresión de la proteína fosforilada normalizada con la de proteína total. Promedio  $\pm$  EEM (n=4 pozos/grupo). \* $P < 0.05$  vs sin tratamiento # $P < 0.05$  vs Ucn2 20 min.

### 7.14 Expresión del RNAm de péptidos asociados con el apetito en las células mHypoA-2/30 después de los tratamientos con Ucn2

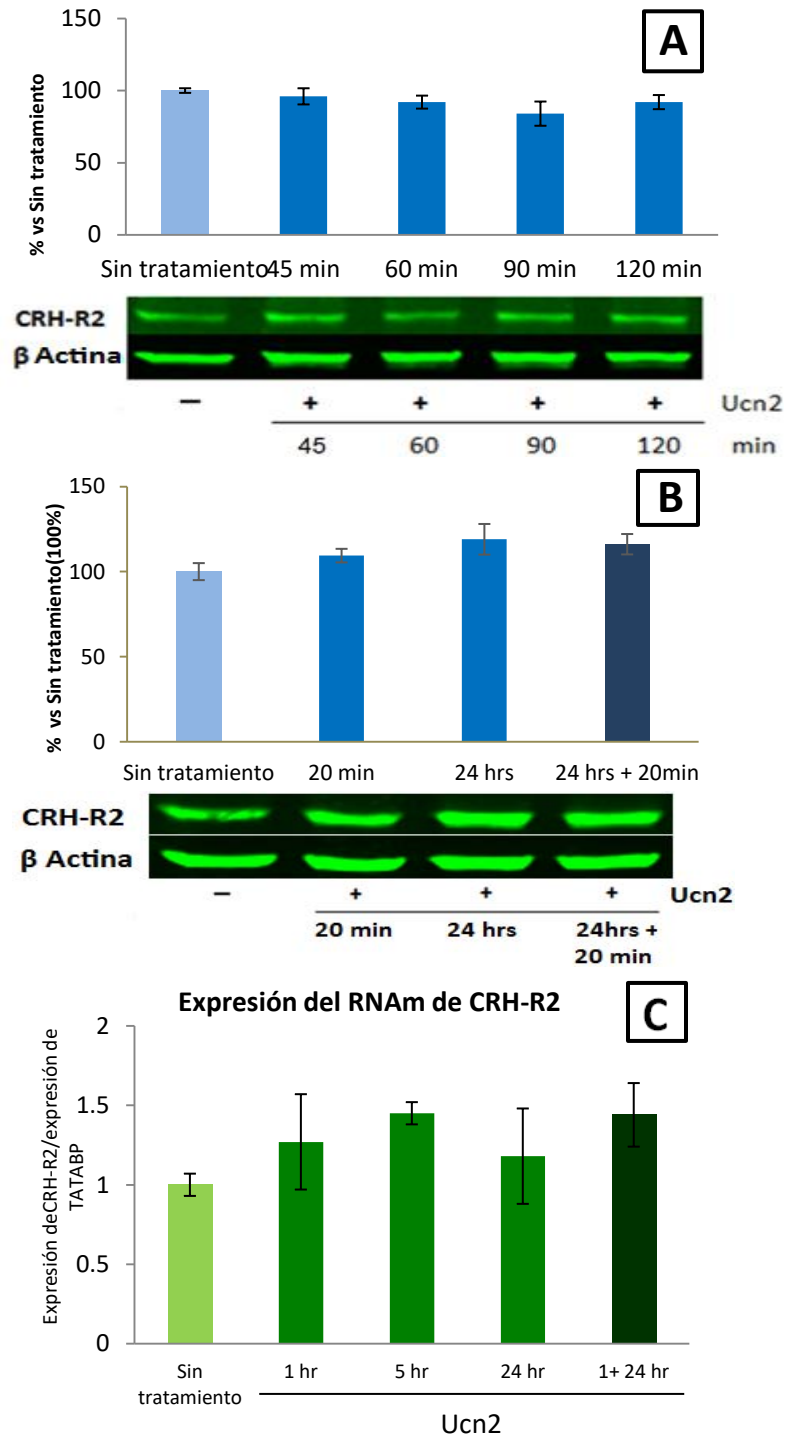
Se observó incremento en la expresión del RNAm de los péptidos anorexigénicos POMC y neurotensina con un estímulo de 100 nM de Ucn2 durante 24 h. Este mismo tratamiento inhibió la expresión del péptido orexigénico NPY. Cuando se aplicó un pre-tratamiento con Ucn2 (100 nM) durante 1 h (para promover la internalización del receptor) y luego otro de la misma concentración de Ucn2 por 24 h no se incrementó el RNAm de POMC ni neurotensina como se había observado con un solo tratamiento. Ambos tratamientos inhibieron la síntesis de NPY. El ANOVA de una vía mostró efecto del tratamiento para POMC  $F_{(2,35)} = 5.903$ ,  $P < 0.01$ ; para neurotensina  $F_{(2,23)} = 4.778$ ,  $P < 0.05$ ; para NPY  $F_{(2,30)} = 3.75$ ,  $P < 0.05$  (Figura 17).



**Figura 17.** Incremento e inhibición de la expresión del RNAm de los péptidos anorexigénicos POMC y Neurotensina con uno o dos estímulos de Ucn2, respectivamente. Ambos tratamientos disminuyeron la expresión del péptido orexigénico NPY. La expresión de cada gen está normalizada con la de TATABP. Promedio  $\pm$  EEM (n=8-10 pozos/grupo). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Sin tratamiento; + $P < 0.05$ , ++ $P < 0.01$  vs Ucn2 24hrs.

### 7.15 Expresión de la proteína y RNAm de CRH-R2 en las células mHypoA-2/30 después de los diversos tratamientos con Ucn2.

No se encontraron cambios en la expresión de la proteína CRH-R2 total (Figura 18 A y B), ni en los niveles de su RNAm (Figura 18 C) con ninguno de los tratamientos de 100 nM de Ucn2 aplicados a la línea celular mHypoA-2/30.



**Figura 18.** Los diferentes tratamientos de Ucn2 (agudo por diferentes tiempos en **A** y **B** o doble en **B** y **C**) no modificaron la expresión de la proteína CRH-R2 total (**A** y **B**) ni de su RNAm (**C**) en células mHypoA 2-30 en cultivo. Promedio  $\pm$  EEM (n=4 pozos/grupo para proteína y n=5-8/grupo para RNAm).

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que tanto la conducta alimentaria como algunos parámetros bioquímicos que indican la funcionalidad del receptor CRH-R2, están alterados en animales adultos sometidos a SM durante el periodo de lactancia y que dicha alteración en la actividad del receptor podría deberse a una constante estimulación por su ligando con mayor afinidad: la Ucn2 [86] dada su alta expresión en el NPV de estos animales y la capacidad de este ligando para modificar la señalización de CRH-R2 encontrada en cultivos de células hipotalámicas.

### 8.1 Consumo de alimento y ganancia de peso

Al igual que en análisis previos [41;76;87], en este trabajo se confirmó el desarrollo de hiperfagia en los animales con SM, la cual trajo como consecuencia un incremento en la ganancia de peso corporal semanal comparada con la del grupo control. En estudios clínicos también se ha reportado una asociación entre haber sufrido diferentes tipos de estrés en la infancia y un incrementado consumo de alimento que lleva a sobrepeso-obesidad en la adultez [70-73]; sin embargo, los mecanismos bioquímicos involucrados aún no están completamente establecidos.

En el modelo de SM, la hiperfagia que desarrollan los animales se ha asociado a una hiperactivación del eje HPA, la cual promueve incrementos en la concentración de glucocorticoides de manera crónica [41;76] que se han asociado a mayor acumulación de grasa visceral y consumo de alimentos [69].

El exceso de glucocorticoides de manera crónica disminuye la sensibilidad a la leptina e insulina en el hipotálamo, reduciendo también el efecto supresor del apetito de estas hormonas [88]. En animales sometidos a SM se han reportado alteraciones en la señalización de leptina en el hipotálamo [89] y un mayor riesgo a desarrollar síndrome metabólico por resistencia a la insulina, incrementos de glucosa plasmática en ayuno y mayor ganancia de peso asociados a niveles elevados de corticosterona en estado basal [90]. Los glucocorticoides además, tienen un efecto estimulador sobre la actividad de la AMPK incrementando la síntesis y secreción de péptidos orexigénicos e inhibiendo la síntesis de POMC en el núcleo arcuato hipotalámico [91]. Al respecto, las evidencias encontradas en animales con SM no son concluyentes ya que se reporta aumento del RNAm de POMC [92]; mayor concentración de NPY en el hipotálamo [93], pero con una expresión basal de su RNAm similar a la de los controles [92]. Además, menor incremento en la síntesis de NPY en respuesta al ayuno [92] que en conjunto no son compatibles con

el incremento en consumo de alimento y ganancia de peso que desarrollan los animales con SM. Debido a esto, en el presente trabajo analizamos la funcionalidad del receptor CRH-R2 que podría modular estos factores y estar implicado en la hiperfagia de animales sometidos al modelo de estrés post-natal por SM.

## 8.2 Expresión genética de los receptores a CRH y sus ligandos en el NPV

El primer paso en el análisis de la funcionalidad de CRH-R2 de ratas con SM fue comparar la expresión de su RNAm con la de ratas control en el NPV, encontrándose un incremento en su síntesis. Del CRH-R2 no se ha descrito mayor o menor expresión genética en relación directa con su actividad, sin embargo, la incrementada expresión del CRH-R2 en el NPV de las ratas con SM aunado a su mayor consumo de alimento, sugería que en estas ratas con estrés post-natal el aumento en el RNAm obedece a un mecanismo compensatorio por una disfuncionalidad del receptor que conduciría a la hiperfagia.

En apoyo a esta asociación, los animales transgénicos que sobreexpresan CRH en el SNC además de incrementar su consumo de alimento, también presentan menor activación de neuronas del núcleo arcuato en respuesta al ayuno, lo que indica su vulnerabilidad a desarrollar hiperfagia [44;94], posiblemente por una desensibilización del receptor CRH-R2 provocada por la unión constante de la CRH.

La modulación central de la expresión de ambos receptores a CRH (CRH-R1 y CRH-R2) por una estimulación prolongada con esta hormona sigue un patrón región específico, en el cual se observa un incremento en la expresión del RNAm de CRH-R2 en el rafé dorsal pero, una disminución del RNAm del CRH-R1 en regiones como el septum lateral, *substantia nigra compacta* y el núcleo sub-talámico [95].

En los animales con SM también se observó una expresión diferencial de los receptores a CRH en el NPV donde incrementó el RNAm de CRH-R2 y disminuyó el de CRH-R1. Aunque no se sabe si la CRH fue responsable de dichos cambios [95], la expresión de esta hormona también incrementó en los animales con SM; además, la inyección i.c.v. de la CRH reduce el RNAm del CRH-R1 en el diencefalo (en donde se encuentran estructuras como el tálamo y el hipotálamo) [96] aunque este mismo tratamiento no tiene efecto en la expresión del CRH-R2 en el NPV [52] [96].

Dado que en experimentos *in vitro*, el receptor CRH-R2 puede ser desensibilizado no solo por la CRH, sino de manera más potente por sus ligandos específicos las Ucns [47-49],



analizamos también la expresión de Ucn2 y Ucn3, en el NPV ya que son sintetizadas en respuesta al estrés.

Las ratas del grupo SM presentaron incremento en la expresión de Ucn2, que aunque no se conoce su efecto directo sobre la síntesis de CRH-R2 en el cerebro, incrementa el RNAm del este receptor en células de pituitaria (LβT2) y disminuye el RNAm de CRH-R1 [97]. Por otro lado, aunque la inyección central de Ucn3 provoca también una tendencia al incremento del RNAm de CRH-R2 en el diencefalo [96], dado que las ratas con SM no presentaron cambio en la expresión de Ucn3, no pareció ser responsable de la incrementada síntesis del receptor en los animales estresados.

Debido a esto, el incremento en el RNAm de CRH-R2 en el NPV acompañado de una disminución en la expresión de CRH-R1 en los animales con SM podría indicar una exposición crónica tanto a la Ucn2 como a la CRH las cuales modificarían de manera diferencial la expresión de cada tipo de receptor.

Aunque el RNAm del CRH-R2 aumentó en los animales con SM, su funcionalidad parece disminuída y el incremento en la síntesis de Ucn2 en el NPV encontrado en las ratas con SM lo apoya, ya que siendo un péptido anorexigénico [16;62;63] no provocó inhibición en el consumo de alimento de las ratas con SM. Esto nos permite suponer que de haberse incrementado también la traducción del RNAm de Ucn2 a proteína de manera crónica, habría inducido una estimulación constante de CRH-R2 provocando una desensibilización homóloga.

Este tipo de respuesta se ha observado en otros receptores hipotalámicos de péptidos anorexigénicos como la leptina. Una sobre-exposición a esta hormona trae como consecuencia la desensibilización de su receptor, provocando una disminuida funcionalidad y como mecanismo compensatorio un incremento en el RNAm del receptor ObRb en el hipotálamo [98;99].

De manera similar, la estimulación constante del receptor CRH-R2 por la Ucn2 pudo inhibir la funcionalidad del receptor, favoreciendo la hiperfagia de los animales con SM.

Se ha propuesto la acción parácrina de la Ucn2 en el NPV [15;20] y se ha observado que aumenta su contenido de RNAm en respuesta a estrés agudo por inmovilidad en neuronas parvocelulares del este núcleo hipotalámico [21]. Esto parece derivarse del incremento en corticosterona posterior al estrés, puesto que la región promotora del gen de Ucn2 de ratón presenta 14 sitios GRE (unión del receptor de glucocorticoides) que

incrementan la expresión del péptido en respuesta a dexametasona [22]. No obstante, la expresión de Ucn2 en modelos de estrés crónico no se había analizado hasta ahora, encontrándose incrementada en los animales adultos con SM, probablemente por las altas concentraciones de corticosterona sérica reportadas en los animales SM adultos [41] [76;90].

### 8.3 Expresión proteica de CRH-R2 en el NPV

Debido a que la Ucn2 es uno de los ligandos específicos de CRH-R2 y de acuerdo a lo descrito en estudios *in vitro* sobre el potencial del péptido para desensibilizar e internalizar al receptor [47-49]; comparamos los niveles de proteína CRH-R2 en la fracción citosólica y membranal del NPV entre animales control y con SM. Se encontró solo una tendencia a la disminución en el contenido del CRH-R2 en la fracción membranal de animales con SM. La internalización del CRH-R2 $\alpha$ , el subtipo que se expresa con preferencia en el SNC [6;7] provocada por la unión de Ucn2 conlleva al reclutamiento de  $\beta$ -arrestinas del tipo 2 cuando el receptor es fosforilado, posiblemente por una cinasa de proteínas-acopladas-a-proteína G (GRK) [47]. Esto se vincula a una menor señalización del receptor, puesto que el desacoplamiento de CRH-R2 de la subunidad  $\alpha$  de la proteína Gs disminuye la unión posterior del ligando Ucn2 [100].

Sin embargo, nuestros resultados indicaron que en los animales con SM la estimulación con Ucn2 no se reflejó en cambios significativos en la distribución celular del receptor a pesar del efecto que la SM tuvo incrementando el RNAm de CRH-R2. Esto no llevó a mayor presencia de la proteína en ninguna de las fracciones celulares del NPV analizadas (membranal o citosólica).

Uno de los mecanismos que evita la traducción de RNAm a proteína es el sistema UPR (por sus siglas en inglés: Unfolded-Protein response)[101], que es inducido en condiciones de estrés [102] y de obesidad [103]. Este sistema degrada proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico por lo que evita que el incremento en el contenido de RNAm repercuta en la concentración de proteína.

En el hipotálamo de ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasa, la activación del sistema UPR y alteraciones del plegado de receptor a leptina, contribuyen a la resistencia a dicha hormona [104].

La activación del sistema UPR y consecuente alteración de receptores acoplados a proteína G también puede deberse a variantes dominantes negativas (DN) del gen correspondiente, ya que se retienen complejos (receptor funcional – variante DN) dentro

del retículo endoplásmico, y esto lleva a menor presencia y funcionalidad de los receptores en la membrana celular [105].

Aunque no se conoce si existen variantes similares de CRH-R2 $\alpha$  (el sub-tipo expresado en el hipotálamo), se conoce la existencia de una variante de CRH-R2 $\beta$  [insertion variant (iv)-mCRH-R2 $\beta$ ] en células cardíacas de ratón, que provoca la retención de los complejos receptor funcional – variante DN en el retículo endoplásmico, disminuyendo la producción de AMPc cuando las células son tratadas con Ucn2 [102]. Es importante destacar que el RNAm de la (iv)-mCRH-R2 $\beta$  incrementa en tejido cardíaco cuando los ratones son sometidos a estrés crónico variable durante 4 semanas [102]. De manera que si existieran variantes DN de CRH-R2 $\alpha$  en el hipotálamo, un fenómeno similar pudiera presentarse en animales con SM impidiendo el incremento de la proteína CRH-R2 con la degradación de proteínas mal plegadas por el sistema UPR. De esta manera, los animales con SM que además de mayor ganancia de peso corporal presentan también estrés crónico pudieron tener activado el sistema UPR, inhibiendo la síntesis de proteína CRH-R2 aunque es un punto que requiere mayor estudio.

Otra posibilidad es que un micro RNA no codificante (miRNA) pudiera haber reprimido la traducción del RNAm de CRH-R2 a proteína especialmente porque el modelo de SM promueve incrementos en la expresión de diversos miRNA en regiones como el núcleo accumbens y el hipocampo los cuales se han vinculado a una inhibición en la expresión proteica de receptores de dopamina y serotonina en dichas regiones [106;107] por lo que un mecanismo de índole similar pudo también intervenir la traducción del CRH-R2 en el NPV, pero de igual forma este es otro punto a investigar.

#### 8.4 Funcionalidad del CRH-R2 en el NPV de ratas con SM

A pesar de que los niveles de proteína CRH-R2 no fueron diferentes entre los animales control y SM, se demostraron alteraciones en su funcionalidad al no presentar la misma reacción conductual y bioquímica que los controles tras la administración de Ucn2 intra NPV.

La administración de la Ucn2 inhibió la conducta alimentaria del grupo control tal como se esperaba [16;62;63] mientras que la falta de dicho efecto en las ratas con SM sugirió una alteración en la funcionalidad de su receptor. Esta resistencia a la Ucn2 coincide con observaciones en otro modelo animal asociado con obesidad por sobre-alimentación en el periodo post-natal (reducción de la camada) en el que neuronas del NPV obtenidas de

estas ratas adultas con sobre-alimentación, presentan inhibición en la tasa de disparo cuando son estimuladas con Ucn2 comparada con muestras obtenidas de animales control [108]. Así se puede observar una resistencia a la acción de la Ucn2 en el NPV en 2 modelos animales diferentes vinculados con el desarrollo de hiperfagia.

De igual manera, el aumento en la fosforilación de la proteína CREB, 10 min después de la inyección de Ucn2 en ratas control y la ausencia de dicho aumento en ratas con SM nos indicó una señalización intracelular alterada del receptor del NPV en las ratas estresadas. Estos resultados concuerdan con la menor fosforilación de CREB que tienen los ratones KO para CRH-R2 en regiones como la amígdala basolateral y el HVM en comparación con los animales *wild-type* después de ser sometidos a la prueba de laberinto elevado en cruz utilizada como un estímulo estresante que evalúa la conducta de ansiedad [109]. Adicionalmente, dado que la conducta de ansiedad está incrementada tanto en ratones KO para CRH-R2 como en animales adultos sometidos a SM [76;87;109], no se pueden descartar alteraciones en la señalización de CRH-R2 en otras regiones cerebrales de los animales con SM que también afecten otras conductas además de la alimentaria.

El análisis de los niveles de P-CREB en ratones que sobre-expresan CRH en el SNC muestra una menor fosforilación de dicha proteína en el hipocampo aún cuando las concentraciones de proteína CRH-R1 y CRH-R2 no cambian con respecto al *wild-type* [110]. Esto también indica alteraciones en la señalización intracelular con estímulos constantes aún sin provocar cambios en la presencia de los receptores a la CRH como lo encontrado en las ratas con SM.

Para profundizar en el análisis de ésta vía de segundos mensajeros intracelulares determinamos el contenido de AMPc en el NPV, también 10 min después de la inyección de Ucn2 y contrario a lo que esperábamos, el contenido de AMPc en los animales control administrados con el ligando disminuyó. Esto pudo resultar de un incremento en la degradación de AMPc por fosfodiesterasas (PDEs), enzimas activadas también por incrementos en la concentración de AMPc intracelular [111]. Al ser un estudio *in vivo* el tiempo de sacrificio de los animales es un factor limitante en el estudio de moléculas con efecto rápido, como es el caso del AMPc formado tras la activación de CRH-R2, lo que se ha demostrado ampliamente en estudios *in vitro* [47-49]; de hecho, la adición de Ucn1, otro ligando con gran afinidad por CRH-R2 a células cardíacas en cultivo incrementa la

concentración de AMPc desde los 2 minutos, con un pico máximo a los 5 min, a partir del cual la concentración comienza a disminuir [112]. Sin embargo, el incremento en P-CREB a los 10 min posteriores a la inyección con Ucn2 nos permitió suponer que la formación de AMPc se llevó a cabo previamente. Esto pudo activar tanto a la proteína-quinasa A (PKA), responsable de fosforilar a CREB, como a las PDEs, que degradan AMPc. Por lo tanto, la disminución en la concentración de AMPc observada tras la administración de Ucn2 aún refleja la funcionalidad del receptor CRH-R2 en las ratas control. Dado que dicha disminución en el contenido de AMPc no se presentó en animales del grupo SM administrados con Ucn2, esto también se interpretó como inhibición en la vía de señalización de CRH-R2.

#### 8.5 Expresión y funcionalidad del CRH-R2 en la línea celular mHypoA-2/30

Por medio del estudio *in vitro* analizamos la vía de señalización de CRH-R2 en neuronas hipotalámicas. La línea celular de ratón adulto mHypoA-2/30 fue elegida para este análisis ya que expresa el factor de transcripción llamado single-minded homolog 1 (SIM-1) que se encuentra particularmente en neuronas del NPV y es necesario para su desarrollo [113]; además estas líneas celulares expresan marcadores de neuronas completamente diferenciadas como la enolasa específica de neuronas (NSE) [83]. Por lo tanto en la línea celular mHypoA-2/30 se encuentran neuronas completamente diferenciadas provenientes del NPV, aunque se tomó en cuenta la presencia de células provenientes de otros núcleos hipotalámicos, lo que a su vez permitió estudiar el efecto de la Ucn2 sobre la expresión de péptidos orexigénicos y anorexigénicos que se sintetizan en núcleos hipotalámicos como el arcuato o el lateral.

Se observó que la línea celular mHypoA-2/30 expresa receptores CRH-R2 funcionales ya que su estimulación con Ucn2 generó la fosforilación de CREB a los 20, 40 min y 24 h. Un periodo de tiempo equivalente fue requerido para la fosforilación de CREB en esta misma línea celular al estimular al receptor del péptido similar a la insulina 1, otro receptor transmembranal acoplado a proteína  $G\alpha_s$  [114]. Aunque también se ha reportado una respuesta más rápida (5-20 min) en la fosforilación de CREB al estimular al receptor MC4 con su ligando  $\alpha$ -MSH (hormona estimulante de melanocito  $\alpha$ ) en estas células hipotalámicas [115]. Lo anterior probablemente obedezca a la abundancia de cada receptor en la línea celular, aunque aún no se ha comparado. Por lo tanto el tiempo requerido para la activación de esta vía de segundos mensajeros intracelulares en las células mHypoA-2/30 parece ser de 5 a 40 min dependiendo del receptor que se active.

Se analizó además la fosforilación de la AMPK en respuesta a Ucn2 porque estímulos que generan anorexia como leptina e insulina inhiben su actividad, mientras que hormonas como la grelina favorecen su fosforilación, lo que incrementa su actividad y la expresión de péptidos orexigenicos en el hipotálamo, estimulando así la conducta alimentaria [61].

Nuestros resultados muestran que el efecto anorexigénico de la Ucn2 podría estar mediado por una inhibición en la fosforilación de AMPK encontrada a los 20, 90 y 120 min de tratamiento con Ucn2 en el medio de cultivo. En estas mismas líneas celulares hipotalámicas, se observa una menor relación P-AMPK/AMPK total cuando son tratadas con una concentración alta de glucosa (5 nM) [116] a tiempos similares. Este efecto se presenta de acuerdo a la función de la AMPK fosforilada en el incremento de la síntesis de péptidos que estimulan el apetito como NPY y AgRP por lo que la inhibición de P-AMPK contribuiría al efecto contrario, anorexia.

#### 8.6 Monitoreo de la localización celular del CRH-R2 en la línea mHypoA-2/30

Se observó una re-distribución intracelular del receptor después de ser estimulado con Ucn2. En las células no tratadas el CRH-R2 estuvo distribuido homogéneamente en el citoplasma y después de 1, 2 y 4 h de tratamiento con Ucn2 ocupó una región peri-nuclear más restringida, lo que pudo indicar que hay un menor número de receptores en la membrana celular después del tratamiento.

En células HEK293 con sobreexpresión de CRH-R2 puede observarse de manera más clara la internalización del receptor cuando son tratadas con 100 nM de Ucn2 desde los 30 min [48;84]. No obstante, puesto que en la línea celular mHypoA-2/30 se trata del efecto de la Ucn2 en la distribución sub-celular del CRH-R2 endógeno (no sobre-expresado) el tiempo requerido para observar el efecto fue mayor; sin embargo, a partir de 1 h la señal de CRH-R2 se intensificó alrededor del núcleo, sugiriendo su internalización a partir de este punto temporal.

#### 8.7 Efecto del tratamiento prolongado con Ucn2 sobre la fosforilación de CREB y AMPK en la línea celular mHypoA-2/30

Al analizar las vías de señalización intracelular activadas por la estimulación prolongada de CRH-R2 se encontró que la respuesta inhibitoria de la AMPK observada a los 20 min se alteró cuando el receptor es estimulado durante 24 h incrementándose; además al aplicar un segundo estímulo de Ucn2 no se presentó la respuesta inhibitoria. Este

tratamiento no provocó una mayor respuesta en la fosforilación de CREB, que permaneció incrementada con el tratamiento de 24 h. De manera que un tratamiento prolongado con Ucn2 no modificó la vía de PKA, pero sí alteró la de AMPK la cual inhibió su respuesta ante un segundo estímulo agudo con Ucn2.

La alterada señalización de la vía de la AMPK con el tratamiento prolongado de Ucn2 pudo derivarse de cambios en la interacción de las vías de segundos mensajeros intracelulares. Al respecto, en la línea celular hipotalámica GT1-7 se han reportado interacciones entre la activación de PKA, seguida de la activación de ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares) y la inhibición de la fosforilación de AMPK al activar al receptor MC4 [117]. Puesto que las ERK1/2 pueden ser activadas por Ucn2 y a que esta activación se inhibe cuando CRH-R2 está internalizado [84], es posible que la alterada señalización de AMPK después de la estimulación prolongada de CRH-R2 en las células mHypoA-2/30 se deba a estas interacciones entre PKA, ERK1/2 y AMPK.

Otra interacción que se conoce entre la vía de PKA y la de AMPK es la inhibición de la CaMKK $\beta$  (Cinasa de proteínas cinasas dependiente de Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina  $\beta$ ) por PKA, con lo cual se inhibe la fosforilación de AMPK. Este mecanismo está alterado en la resistencia al efecto anorexigénico de glucagon en el núcleo arcuato de ratas alimentadas con dieta alta en grasa [118], de manera que una alterada señalización de CaMKK $\beta$  pudo estar involucrada también en la resistencia que presentan las células con tratamiento prolongado del ligando a los efectos inhibidores de la Ucn2 sobre AMPK.

Por lo tanto, aunque los mecanismos involucrados en la resistencia del receptor CRH-R2 al efecto de la Ucn2 sobre AMPK requieren mayor estudio, se sugiere que las interacciones entre las vías de segundos mensajeros intracelulares pudieron estar implicadas en este fenómeno encontrado en las células mHypoA-2/30.

De esta forma, la alterada funcionalidad de CRH-R2 del NPV en los animales con SM que fue evidente con la inhibición de la fosforilación de CREB después de la inyección de Ucn2 no se observó en los experimentos con la línea celular mHypoA-2/30, ya que el incremento en la relación P-CREB/CREB no disminuyó aun con el tratamiento prolongado de Ucn2. En el cultivo celular la alterada funcionalidad de CRH-R2 se vió reflejada más bien en alteraciones en la señalización de la AMPK. Sin embargo no se puede comparar el efecto de la Ucn2 en los modelos *in vivo* e *in vitro* empleados en el presente estudio debido a que la fosforilación de la AMPK no fue analizada en los animales con SM y a que

el estímulo de las células del NPV con la Ucn2 endógena en los animales pudo ser más prolongado que el que recibieron las células en cultivo.

No obstante, de manera independiente ambos modelos mostraron alteraciones en la señalización intracelular de CRH-R2 lo que indicó que este receptor es vulnerable a perder su funcionalidad, resultando alteradas vías de segundos mensajeros intracelulares, tras la exposición prolongada a Ucn2.

#### 8.8 Efecto de la activación de CRH-R2 sobre la expresión de péptidos hipotalámicos moduladores del apetito

Mientras que un solo estímulo con Ucn2 incrementó el RNAm de POMC y neurotensina, este efecto se inhibió cuando las células fueron pre-tratadas con el ligando para promover la internalización del receptor. Esto nos indica que al igual que las vías de señalización, el efecto de la Ucn2 en la expresión genética de los péptidos anorexigénicos (consecuencia de la activación de estas vías de segundos mensajeros intracelulares), también se inhibe ante un segundo estímulo del ligando. Esto reforzó la idea de que el tratamiento previo o prolongado con el ligando desensibiliza a CRH-R2.

Además, los resultados sugirieron que la alteración en la vía de la AMPK pudo inhibir la síntesis de POMC y neurotensina en condiciones de desensibilización homóloga del CRH-R2 en este modelo *in vitro*. Aunque la síntesis de POMC mediada por cambios en la activación de AMPK está reportada [61], se requieren más estudios para definir la participación de esta enzima en la expresión genética de neurotensina.

Debido a que no observamos resistencia a la Ucn2 en la fosforilación de CREB ni en el efecto inhibitorio sobre la síntesis de NPY, las acciones Ucn2 sobre la expresión de NPY pudieron estar mediadas por CREB y no parecieron susceptibles a desensibilización. La presencia de un sitio CRE en la región promotora del gen de NPY y la disminución de su RNAm con la activación de PKA apoyan el efecto inhibitorio de P-CREB sobre la síntesis de NPY [119;120].

Tomando en cuenta estas evidencias, la disminuida funcionalidad del CRH-R2 del NPV hipotalámico de los animales con SM pudo favorecer una alteración de las vías de segundos mensajeros intracelulares inhibiendo la expresión de péptidos anorexigénicos y contribuyendo de esta forma al desarrollo de hiperfagia.



### 8.9 Expresión de CRH-R2 con los diferentes tratamientos de Ucn2 en las células mHypoA-2/30

Los tratamientos con Ucn2 aplicados en estas células hipotalámicas no modificaron la expresión de la proteína CRH-R2 total y a diferencia de lo encontrado *in vivo*, el contenido de su RNAm no se incrementó ni con el tratamiento agudo por diferentes tiempos ni con una doble estimulación con el ligando. Lo anterior no descartó la participación de la Ucn2 estimulando la síntesis del CRH-R2 en los animales con SM ya que los modelos son diferentes. La organización, distribución celular y cronicidad del estímulo de Ucn2 difieren entre el tejido cerebral del animal y el pozo de cultivo. No obstante, este resultado indicó que otros factores además de la Ucn2 en el animal estresado por SM pudieron incrementar la síntesis del receptor. Un elemento que pudo estar involucrado es el factor de transcripción Egr-1 (gen de respuesta al crecimiento temprano 1) ya que la región promotora del gen de CRH-R2 presenta un sitio de unión para esta proteína [53] y dado que animales sometidos a SM presentan menor expresión de este factor de transcripción en el hipotálamo [121] pudo regular la expresión del receptor. Aunque sería necesario estudiar el efecto de Egr-1 sobre la síntesis de CRH-R2 hipotalámico.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo indicaron una alterada señalización de CRH-R2 del hipotálamo en animales adultos sometidos a SM durante la lactancia.

La resistencia a los efectos de la Ucn2 en estos animales puede relacionarse con el desarrollo de hiperfagia que presentan.

Los estudios *in vitro*, sugieren que uno de los mecanismos de desensibilización del receptor podría ser su internalización inducida por el ligando.

La hiperfagia de los animales con SM también puede asociarse a una disminuida expresión de péptidos anorexigénicos hipotalámicos, relacionada a la disfuncionalidad de CRH-R2.

Si bien, la vía de señalización de PKA se observó asociada a la disfuncionalidad de CRH-R2 solo en animales con SM, no se puede descartar su intercomunicación con la vía de AMPK.

## 10. REFERENCIAS

- [1] Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 1991 May;12(2):118-34.
- [2] Choi DC, Furay AR, Evanson NK, Ostrander MM, Ulrich-Lai YM, Herman JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 2007 Feb 21;27(8):2025-34.
- [3] Grammatopoulos DK. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br J Pharmacol* 2012 May;166(1):85-97.
- [4] Hillhouse EW, Grammatopoulos DK. The molecular mechanisms underlying the regulation of the biological activity of corticotropin-releasing hormone receptors: implications for physiology and pathophysiology. *Endocr Rev* 2006 May;27(3):260-86.
- [5] Stryer L. *Bioquímica*. 5a ed. Barcelona, España: Reverté; 2003.
- [6] Chalmers DT, Lovenberg TW, De Souza EB. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J Neurosci* 1995 Oct;15(10):6340-50.
- [7] Coste SC, Murray SE, Stenzel-Poore MP. Animal models of CRH excess and CRH receptor deficiency display altered adaptations to stress. *Peptides* 2001 May;22(5):733-41.
- [8] Vale W, Vaughan J, Perrin M. Corticotropin-releasing factor (CRF) family of ligands and their receptors. *The Endocrinologist* 1997;7:3S-9.
- [9] Kostich WA, Chen A, Sperle K, Largent BL. Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2gamma receptor. *Mol Endocrinol* 1998 Aug;12(8):1077-85.
- [10] Perrin M, Donaldson C, Chen R, Blount A, Berggren T, Bilezikjian L, et al. Identification of a second corticotropin-releasing factor receptor gene and characterization of a cDNA expressed in heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Mar 28;92(7):2969-73.
- [11] Bale TL, Contarino A, Smith GW, Chan R, Gold LH, Sawchenko PE, et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. *Nat Genet* 2000 Apr;24(4):410-4.
- [12] Smagin GN, Howell LA, Ryan DH, De Souza EB, Harris RB. The role of CRF2 receptors in corticotropin-releasing factor- and urocortin-induced anorexia. *Neuroreport* 1998 11;9(7):1601-6.
- [13] Maruyama H, Makino S, Noguchi T, Nishioka T, Hashimoto K. Central type 2 corticotropin-releasing hormone receptor mediates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis activation in the rat. *Neuroendocrinology* 2007;86(1):1-16.
- [14] Stengel A, Tache Y. CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Front Neurosci* 2014;8:52.
- [15] Fekete EM, Inoue K, Zhao Y, Rivier JE, Vale WW, Szucs A, et al. Delayed satiety-like actions and altered feeding microstructure by a selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist in rats: intra-hypothalamic urocortin 3 administration reduces food intake by prolonging the post-meal interval. *Neuropsychopharmacology* 2007 May;32(5):1052-68.
- [16] Inoue K, Valdez GR, Reyes TM, Reinhardt LE, Tabarin A, Rivier J, et al. Human urocortin II, a selective agonist for the type 2 corticotropin-releasing factor receptor, decreases feeding and drinking in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 Apr;305(1):385-93.

- [17] Reul JM, Holsboer F. On the role of corticotropin-releasing hormone receptors in anxiety and depression. *Dialogues Clin Neurosci* 2002 Mar;4(1):31-46.
- [18] Cespedes IC, de Oliveira AR, da Silva JM, da Silva AV, Sita LV, Bittencourt JC. mRNA expression of corticotropin-releasing factor and urocortin 1 after restraint and foot shock together with alprazolam administration. *Peptides* 2010 Dec;31(12):2200-8.
- [19] Derks NM, Pinter O, Zuure W, Ledent C, Watanabe M, Molnar CS, et al. Cannabinoid modulation of midbrain urocortin 1 neurones during acute and chronic stress. *J Neuroendocrinol* 2012 Nov;24(11):1447-61.
- [20] Hashimoto K, Nishiyama M, Tanaka Y, Noguchi T, Asaba K, Hossein PN, et al. Urocortins and corticotropin releasing factor type 2 receptors in the hypothalamus and the cardiovascular system. *Peptides* 2004 Oct;25(10):1711-21.
- [21] Tanaka Y, Makino S, Noguchi T, Tamura K, Kaneda T, Hashimoto K. Effect of stress and adrenalectomy on urocortin II mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 2003 Jul;78(1):1-11.
- [22] Chen A, Vaughan J, Vale WW. Glucocorticoids regulate the expression of the mouse urocortin II gene: a putative connection between the corticotropin-releasing factor receptor pathways. *Mol Endocrinol* 2003 Aug;17(8):1622-39.
- [23] Chen P, Vaughan J, Donaldson C, Vale W, Li C. Injection of Urocortin 3 into the ventromedial hypothalamus modulates feeding, blood glucose levels, and hypothalamic POMC gene expression but not the HPA axis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010 Feb;298(2):E337-E345.
- [24] van-Hover C, Li C. Stress-activated afferent inputs into the anterior parvicellular part of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Insights into urocortin 3 neuron activation. *Brain Res* 2015 Jun 22;1611:29-43.
- [25] Pearson CA, Placzek M. Development of the medial hypothalamus: forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. *Curr Top Dev Biol* 2013;106:49-88.
- [26] Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969 May 9;164(3880):719-21.
- [27] Simpson KA, Martin NM, Bloom SR. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2009 Mar;53(2):120-8.
- [28] Brown JA, Woodworth HL, Leininger GM. To ingest or rest? Specialized roles of lateral hypothalamic area neurons in coordinating energy balance. *Front Syst Neurosci* 2015;9:9.
- [29] Date Y, Ueta Y, Yamashita H, Yamaguchi H, Matsukura S, Kangawa K, et al. Orexins, orexigenic hypothalamic peptides, interact with autonomic, neuroendocrine and neuroregulatory systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jan 19;96(2):748-53.
- [30] Tokunaga K, Fukushima M, Kemnitz JW, Bray GA. Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am J Physiol* 1986 Dec;251(6 Pt 2):R1221-R1227.
- [31] Blevins JE, Schwartz MW, Baskin DG. Evidence that paraventricular nucleus oxytocin neurons link hypothalamic leptin action to caudal brain stem nuclei controlling meal size. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004 Jul;287(1):R87-R96.
- [32] Hill JW. PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab* 2012 Dec;16(Suppl 3):S627-S636.
- [33] Chao H, Digruccio M, Chen P, Li C. Type 2 corticotropin-releasing factor receptor in the ventromedial nucleus of hypothalamus is critical in regulating feeding and lipid metabolism in white adipose tissue. *Endocrinology* 2012 Jan;153(1):166-76.

- [34] Nishiyama M, Makino S, Asaba K, Hashimoto K. Leptin effects on the expression of type-2 CRH receptor mRNA in the ventromedial hypothalamus in the rat. *J Neuroendocrinol* 1999 Apr;11(4):307-14.
- [35] Richard D, Rivest R, Naimi N, Timofeeva E, Rivest S. Expression of corticotropin-releasing factor and its receptors in the brain of lean and obese Zucker rats. *Endocrinology* 1996 Nov;137(11):4786-95.
- [36] Makino S, Nishiyama M, Asaba K, Gold PW, Hashimoto K. Altered expression of type 2 CRH receptor mRNA in the VMH by glucocorticoids and starvation. *Am J Physiol* 1998 Oct;275(4 Pt 2):R1138-R1145.
- [37] Eghbal-Ahmadi M, Hatalski CG, Avishai-Eliner S, Baram TZ. Corticotropin releasing factor receptor type II (CRF2) messenger ribonucleic acid levels in the hypothalamic ventromedial nucleus of the infant rat are reduced by maternal deprivation. *Endocrinology* 1997 Nov;138(11):5048-51.
- [38] de Gortari P, Mancera K, Cote-Velez A, Amaya MI, Martinez A, Jaimes-Hoy L, et al. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 2009 Feb;34(2):259-72.
- [39] Kotz CM, Wang C, Levine AS, Billington CJ. Urocortin in the hypothalamic PVN increases leptin and affects uncoupling proteins-1 and -3 in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002 Feb;282(2):R546-R551.
- [40] Krahn DD, Gosnell BA, Levine AS, Morley JE. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. *Brain Res* 1988 Mar 8;443(1-2):63-9.
- [41] Alcántara-Alonso V. *Efecto del estrés en la etapa post-natal sobre el eje adrenal y la vía CRHérgica del sistema límbico y su relación con las conductas alimentaria y depresiva*. 2013.
- [42] Moles A, Bartolomucci A, Garbugino L, Conti R, Caprioli A, Coccorello R, et al. Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. *Psychoneuroendocrinology* 2006 Jun;31(5):623-33.
- [43] Zareian P, Jahromy Z. The effects of immobilization stress on serum ghrelin level, food intake and body weight in male and female rats. *Journal of Archives in Military Medicine* 2015;3(2).
- [44] Dirks A, Groenink L, Bouwknecht JA, Hijzen TH, Van Der Gugten J, Ronken E, et al. Overexpression of corticotropin-releasing hormone in transgenic mice and chronic stress-like autonomic and physiological alterations. *Eur J Neurosci* 2002 Nov;16(9):1751-60.
- [45] Stenzel-Poore MP, Cameron VA, Vaughan J, Sawchenko PE, Vale W. Development of Cushing's syndrome in corticotropin-releasing factor transgenic mice. *Endocrinology* 1992 Jun;130(6):3378-86.
- [46] Tabarin A, Diz-Chaves Y, Consoli D, Monsaingeon M, Bale TL, Culler MD, et al. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci* 2007 Oct;26(8):2303-14.
- [47] Hauger RL, Olivares-Reyes JA, Braun S, Hernandez-Aranda J, Hudson CC, Gutknecht E, et al. Desensitization of human CRF2(a) receptor signaling governed by agonist potency and betaarrestin2 recruitment. *Regul Pept* 2013 Sep 10;186:62-76.
- [48] Markovic D, Punn A, Lehnert H, Grammatopoulos DK. Intracellular mechanisms regulating corticotropin-releasing hormone receptor-2beta endocytosis and interaction with extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Endocrinol* 2008 Mar;22(3):689-706.

- [49] Gutknecht E, Hauger RL, Van dL, I, Vauquelin G, Dautzenberg FM. Expression, binding, and signaling properties of CRF2(a) receptors endogenously expressed in human retinoblastoma Y79 cells: passage-dependent regulation of functional receptors. *J Neurochem* 2008 Feb;104(4):926-36.
- [50] Plotsky PM, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Caldji C, Sharma S, Meaney MJ. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 2005 Dec;30(12):2192-204.
- [51] Pihoker C, Owens MJ, Kuhn CM, Schanberg SM, Nemeroff CB. Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology* 1993;18(7):485-93.
- [52] Mansi JA, Rivest S, Drolet G. Regulation of corticotropin-releasing factor type 1 (CRF1) receptor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus by exogenous CRF. *Endocrinology* 1996 Nov;137(11):4619-29.
- [53] Catalano RD, Kyriakou T, Chen J, Easton A, Hillhouse EW. Regulation of corticotropin-releasing hormone type 2 receptors by multiple promoters and alternative splicing: identification of multiple splice variants. *Mol Endocrinol* 2003 Mar;17(3):395-410.
- [54] Ataka K, Nagaishi K, Asakawa A, Inui A, Fujimiya M. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2012 Aug 15;303(4):G519-G528.
- [55] Lee JY, Lee JH, Kim DG, Jahng JW. Dexamethasone blocks the refeeding-induced phosphorylation of cAMP response element-binding protein in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 2003 Jun 26;344(2):107-11.
- [56] Sotelo-Rivera I, Cote-Velez A, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P. Glucocorticoids curtail stimulus-induced CREB phosphorylation in TRH neurons through interaction of the glucocorticoid receptor with the catalytic subunit of protein kinase A. *Endocrine* 2017 Mar;55(3):861-71.
- [57] Legradi G, Holzer D, Kapcala LP, Lechan RM. Glucocorticoids inhibit stress-induced phosphorylation of CREB in corticotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1997 Aug;66(2):86-97.
- [58] Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* 2004 Apr 1;428(6982):569-74.
- [59] Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* 2004 Mar 26;279(13):12005-8.
- [60] Lim CT, Kola B, Korbonits M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol* 2010 Feb;44(2):87-97.
- [61] Oh TS, Cho H, Cho JH, Yu SW, Kim EK. Hypothalamic AMPK-induced autophagy increases food intake by regulating NPY and POMC expression. *Autophagy* 2016 Nov;12(11):2009-25.
- [62] Fekete EM, Zhao Y, Szucs A, Sabino V, Cottone P, Rivier J, et al. Systemic urocortin 2, but not urocortin 1 or stressin 1-A, suppresses feeding via CRF2 receptors without malaise and stress. *Br J Pharmacol* 2011 Dec;164(8):1959-75.
- [63] Zorrilla EP, Reinhardt LE, Valdez GR, Inoue K, Rivier JE, Vale WW, et al. Human urocortin 2, a corticotropin-releasing factor (CRF)2 agonist, and ovine CRF, a CRF1 agonist, differentially alter feeding and motor activity. *J Pharmacol Exp Ther* 2004 Sep;310(3):1027-34.
- [64] Pellemounter MA, Joppa M, Ling N, Foster AC. Behavioral and neuroendocrine effects of the selective CRF2 receptor agonists urocortin II and urocortin III. *Peptides* 2004 Apr;25(4):659-66.

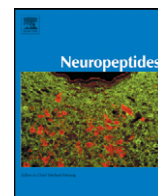
- [65] Alciati A, Gesuele F, Casazza G, Foschi D. The relationship between childhood parental loss and metabolic syndrome in obese subjects. *Stress Health* 2013 Feb;29(1):5-13.
- [66] Benjet C, Borges G, Mendez E, Fleiz C, Medina-Mora ME. The association of chronic adversity with psychiatric disorder and disorder severity in adolescents. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2011 Sep;20(9):459-68.
- [67] Chrousos GP. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuro-endocrine and target tissue-related causes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000 Jun;24 Suppl 2:S50-S55.
- [68] Rojas-Martinez R, Aguilar-Salinas CA, Jimenez-Corona A, Gomez-Perez FJ, Barquera S, Lazcano-Ponce E. Prevalence of obesity and metabolic syndrome components in Mexican adults without type 2 diabetes or hypertension. *Salud Publica Mex* 2012 Jan;54(1):7-12.
- [69] Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab* 2010 Mar;21(3):159-65.
- [70] Greenfield EA, Marks NF. Violence from parents in childhood and obesity in adulthood: using food in response to stress as a mediator of risk. *Soc Sci Med* 2009 Mar;68(5):791-8.
- [71] Michopoulos V, Powers A, Moore C, Villarreal S, Ressler KJ, Bradley B. The mediating role of emotion dysregulation and depression on the relationship between childhood trauma exposure and emotional eating. *Appetite* 2015 Aug;91:129-36.
- [72] McClure HH, Eddy JM, Kjellstrand JM, Snodgrass JJ, Martinez CR, Jr. Child and adolescent affective and behavioral distress and elevated adult body mass index. *Child Psychiatry Hum Dev* 2012 Dec;43(6):837-54.
- [73] Hemmingsson E, Johansson K, Reynisdottir S. Effects of childhood abuse on adult obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2014 Nov;15(11):882-93.
- [74] Loredó-Abdala A, Trejo-Hernández J, García-Piña C, Portillo-González A, Capistrán-Guadalajara A, Carballo-Herrera R, et al. Child abuse: A interdisciplinary care in Mexico. Committee for the study and the integral attention for child abuse. Part one. *Salud Mental* 2010;33(3).
- [75] Secretaría de salud. Informe nacional sobre violencia y salud. 2006. México D.F., SSA.
- [76] Lee JH, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim BT, Kang DW, et al. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci Res* 2007 May;58(1):32-9.
- [77] Ryu V, Lee JH, Yoo SB, Gu XF, Moon YW, Jahng JW. Sustained hyperphagia in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Int J Obes (Lond)* 2008 Sep;32(9):1355-62.
- [78] Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. fifth ed ed. Burlington: ELSEVIER Academic Press; 2005.
- [79] Wang L, Stengel A, Goebel M, Martinez V, Gourcerol G, Rivier J, et al. Peripheral activation of corticotropin-releasing factor receptor 2 inhibits food intake and alters meal structures in mice. *Peptides* 2011 Jan;32(1):51-9.
- [80] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987 Apr;162(1):156-9.
- [81] Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.
- [82] Alvarez-Buylla A, Ling CY, Kirn JR. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *J Neurosci Methods* 1990 Aug;33(2-3):129-33.

- [83] Belsham DD, Fick LJ, Dalvi PS, Centeno ML, Chalmers JA, Lee PK, et al. Ciliary neurotrophic factor recruitment of glucagon-like peptide-1 mediates neurogenesis, allowing immortalization of adult murine hypothalamic neurons. *FASEB J* 2009 Dec;23(12):4256-65.
- [84] Markovic D, Punn A, Lehnert H, Grammatopoulos DK. Molecular determinants and feedback circuits regulating type 2 CRH receptor signal integration. *Biochim Biophys Acta* 2011 May;1813(5):896-907.
- [85] Alcantara-Alonso V, Amaya MI, Matamoros-Trejo G, de GP. Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. *Neuropeptides* 2017 Jun;63:75-82.
- [86] Lewis K, Li C, Perrin MH, Blount A, Kunitake K, Donaldson C, et al. Identification of urocortin III, an additional member of the corticotropin-releasing factor (CRF) family with high affinity for the CRF2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jun 19;98(13):7570-5.
- [87] Ryu V, Yoo SB, Kang DW, Lee JH, Jahng JW. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Res* 2009 Oct 27;1295:127-34.
- [88] Asensio C, Muzzin P, Rohner-Jeanrenaud F. Role of glucocorticoids in the physiopathology of excessive fat deposition and insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004 Dec;28 Suppl 4:S45-S52.
- [89] Lee JH, Yoo SB, Kim JY, Lee JY, Kim BT, Park K, et al. Early life stress experience may blunt hypothalamic leptin signalling. *J Biosci* 2017 Mar;42(1):131-8.
- [90] Vargas J, Junco M, Gomez C, Lajud N. Early Life Stress Increases Metabolic Risk, HPA Axis Reactivity, and Depressive-Like Behavior When Combined with Postweaning Social Isolation in Rats. *PLoS One* 2016;11(9):e0162665.
- [91] Shimizu H, Arima H, Watanabe M, Goto M, Banno R, Sato I, et al. Glucocorticoids increase neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression via adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling in the arcuate nucleus of rats. *Endocrinology* 2008 Sep;149(9):4544-53.
- [92] Kim HJ, Lee JH, Choi SH, Lee YS, Jahng JW. Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 2005 Dec;39(6):587-94.
- [93] Jimenez-Vasquez PA, Mathe AA, Thomas JD, Riley EP, Ehlers CL. Early maternal separation alters neuropeptide Y concentrations in selected brain regions in adult rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2001 Nov 26;131(1-2):149-52.
- [94] Stengel A, Goebel M, Million M, Stenzel-Poore MP, Kobelt P, Monnikes H, et al. Corticotropin-releasing factor-overexpressing mice exhibit reduced neuronal activation in the arcuate nucleus and food intake in response to fasting. *Endocrinology* 2009 Jan;150(1):153-60.
- [95] Korosi A, Veening JG, Kozicz T, Henckens M, Dederen J, Groenink L, et al. Distribution and expression of CRF receptor 1 and 2 mRNAs in the CRF over-expressing mouse brain. *Brain Res* 2006 Feb 9;1072(1):46-54.
- [96] Khan MS, Kaiya H, Tachibana T. Central injection of urocortin-3 but not corticotrophin-releasing hormone influences the ghrelin/GHS-R1a system of the proventriculus and brain in chicks. *Domest Anim Endocrinol* 2014 Apr;47:27-34.
- [97] Kageyama K, Murasawa S, Niioka K, Otsuka F, Yagi H, Daimon M. Regulation of gonadotropins by urocortin 2 in gonadotropic tumor LbetaT2 cells. *Neurosci Lett* 2017 Aug 26;660:63-7.



- [98] Lin S, Storlien LH, Huang XF. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res* 2000 Sep 1;875(1-2):89-95.
- [99] Page KC, Malik RE, Ripple JA, Anday EK. Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 Oct;297(4):R1049-R1057.
- [100] Hoare SR, Sullivan SK, Fan J, Khongsaly K, Grigoriadis DE. Peptide ligand binding properties of the corticotropin-releasing factor (CRF) type 2 receptor: pharmacology of endogenously expressed receptors, G-protein-coupling sensitivity and determinants of CRF2 receptor selectivity. *Peptides* 2005 Mar;26(3):457-70.
- [101] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007 Jul;8(7):519-29.
- [102] Sztainberg Y, Kuperman Y, Issler O, Gil S, Vaughan J, Rivier J, et al. A novel corticotropin-releasing factor receptor splice variant exhibits dominant negative activity: a putative link to stress-induced heart disease. *FASEB J* 2009 Jul;23(7):2186-96.
- [103] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science* 2006 Aug 25;313(5790):1137-40.
- [104] Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* 2009 Jan 7;9(1):35-51.
- [105] Granell S, Mohammad S, Ramanagoudr-Bhojappa R, Baldini G. Obesity-linked variants of melanocortin-4 receptor are misfolded in the endoplasmic reticulum and can be rescued to the cell surface by a chemical chaperone. *Mol Endocrinol* 2010 Sep;24(9):1805-21.
- [106] Bai M, Zhu XZ, Zhang Y, Zhang S, Zhang L, Xue L, et al. Anhedonia was associated with the dysregulation of hippocampal HTR4 and microRNA Let-7a in rats. *Physiol Behav* 2014 Apr 22;129:135-41.
- [107] Zhang Y, Zhu X, Bai M, Zhang L, Xue L, Yi J. Maternal deprivation enhances behavioral vulnerability to stress associated with miR-504 expression in nucleus accumbens of rats. *PLoS One* 2013;8(7):e69934.
- [108] Davidowa H, Plagemann A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. *Neurosci Lett* 2004 Nov 16;371(1):64-8.
- [109] Kishimoto T, Radulovic J, Radulovic M, Lin CR, Schrick C, Hooshmand F, et al. Deletion of *crhr2* reveals an anxiolytic role for corticotropin-releasing hormone receptor-2. *Nat Genet* 2000 Apr;24(4):415-9.
- [110] Kasahara M, Groenink L, Olivier B, Sarnyai Z. Corticotropin-releasing factor (CRF) over-expression down-regulates hippocampal dopamine receptor protein expression and CREB activation in mice. *Neuro Endocrinol Lett* 2011;32(2):193-8.
- [111] Bender AT, Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Rev* 2006 Sep;58(3):488-520.
- [112] Nishikimi T, Miyata A, Horio T, Yoshihara F, Nagaya N, Takishita S, et al. Urocortin, a member of the corticotropin-releasing factor family, in normal and diseased heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000 Dec;279(6):H3031-H3039.
- [113] Tung S, Hardy AB, Wheeler MB, Belsham DD. Serotonin (5-HT) activation of immortalized hypothalamic neuronal cells through the 5-HT1B serotonin receptor. *Endocrinology* 2012 Oct;153(10):4862-73.

- [114] Dalvi PS, Nazarians-Armavil A, Purser MJ, Belsham DD. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4, regulates feeding-associated neuropeptides in hypothalamic neurons in vivo and in vitro. *Endocrinology* 2012 May;153(5):2208-22.
- [115] Breit A, Wicht K, Boekhoff I, Glas E, Lauffer L, Muckter H, et al. Glucose Enhances Basal or Melanocortin-Induced cAMP-Response Element Activity in Hypothalamic Cells. *Mol Endocrinol* 2016 Jul;30(7):748-62.
- [116] Chalmers JA, Jang JJ, Belsham DD. Glucose sensing mechanisms in hypothalamic cell models: glucose inhibition of AgRP synthesis and secretion. *Mol Cell Endocrinol* 2014 Jan 25;382(1):262-70.
- [117] Damm E, Buech TR, Gudermann T, Breit A. Melanocortin-induced PKA activation inhibits AMPK activity via ERK-1/2 and LKB-1 in hypothalamic GT1-7 cells. *Mol Endocrinol* 2012 Apr;26(4):643-54.
- [118] Quinones M, Al-Massadi O, Gallego R, Ferno J, Dieguez C, Lopez M, et al. Hypothalamic CaMKKbeta mediates glucagon anorectic effect and its diet-induced resistance. *Mol Metab* 2015 Dec;4(12):961-70.
- [119] Larhammar D, Ericsson A, Persson H. Structure and expression of the rat neuropeptide Y gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Apr;84(7):2068-72.
- [120] Hsieh YS, Yang SF, Kuo DY. Intracerebral administration of protein kinase A or cAMP response element-binding protein antisense oligonucleotide can modulate amphetamine-mediated appetite suppression in free-moving rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007 Jan;292(1):E123-E131.
- [121] Navailles S, Zimnisky R, Schmauss C. Expression of glucocorticoid receptor and early growth response gene 1 during postnatal development of two inbred strains of mice exposed to early life stress. *Dev Neurosci* 2010 Jul;32(2):139-48.



# Altered functionality of the corticotrophin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats



V Alcántara-Alonso, M.I. Amaya, G Matamoros-Trejo, P de Gortari \*

Laboratory of Molecular Neurophysiology, Department of Neurosciences Research, National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 14 November 2016  
Received in revised form 31 January 2017  
Accepted 31 January 2017  
Available online 1 February 2017

### Keywords:

Early-life stress  
Urocortins  
CRH-R2  
Food intake  
Hypothalamic paraventricular nucleus

## ABSTRACT

Early-life stress induces endocrine and metabolic alterations that increase food intake and overweight in adulthood. The stress response activates the corticotrophin-releasing hormone (CRH) and urocortins' (Ucns) system in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). These peptides induce anorexic effects through CRH-R2 receptor activation; however, chronic stressed animals develop hyperphagia despite of high PVN CRH expression. We analyzed this paradoxical behavior in adult rats subjected to maternal separation (MS) for 180 min/daily during post-natal days 2–14, evaluating their body weight gain, food intake, serum corticosterone and vasopressin concentrations, PVN mRNA expression of CRH-R1, CRH-R2, CRH, Ucn2, Ucn3, vasopressin and CRH-R2 protein levels. MS adults increased their feeding, weight gain as well as circulating corticosterone and vasopressin levels, evincing chronic hyperactivity of the stress system. MS induced higher PVN CRH, Ucn2 and CRH-R2 mRNA expression and protein levels of CRH-R2 showed a tendency to decrease in the cellular membrane fraction. An intra-PVN injection of the CRH-R2 antagonist antisauvagine-30 in control adults increased receptor's mRNA expression, mimicking the observed PVN receptor's up-regulation of early-life MS adults. An injection of Ucn-2 directly into the PVN reduced food intake and increased PVN pCREB/CREB ratio in control animals; in contrast, Ucn-2 was unable to reduce food intake and enhance phosphorylated-CREB levels in PVN of MS rats. In conclusion, the chronic hyperactivity of the stress axis and PVN CRH-R2 resistance to Ucn2 effects, supported impaired receptor functionality in MS animals, probably due to its chronic stimulation by CRH or Ucn2, induced by early-life stress.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Stressful situations demand energy availability allowing individuals to escape or to confront a threatening challenge, with resulting alterations in energy homeostasis. Stress response involves the stimulation of corticotrophin-releasing hormone (CRH) synthesis in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), which directs the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis' function. Being released from the median eminence, CRH reaches the portal blood and stimulates the release of adenohipophysal corticotrophin (ACTH) that targets the adrenals and increases circulating glucocorticoids (GC, corticosterone) concentration. Effects of serum GC may involve activation of catabolic processes or accumulation of lipids depending on stressor's nature, intensity and chronicity.

High corticosterone concentration resulting from an acute stressful event is able to reduce PVN CRH expression to basal levels as a negative feedback mechanism (Makino et al., 1995), which is an adaptive mechanism allowing the reset of HPA axis until ready to respond to a subsequent threat. As a result, serum GC levels return to values of unstressed animals. Nevertheless when the stressful stimulus becomes chronic, the high circulating GCs remain elevated due to an impaired inhibition of CRH mRNA synthesis in the PVN, along with an increased content of vasopressin, which maintain the HPA axis hyperactivity (Aguilera et al., 2008; Makino et al., 1995).

The behavioral response to acute or chronic stress conditions is also modulated by the CRH system. During acute stress, the synthesis of CRH and of its analogues Urocortin 2 (Ucn2) and Urocortin 3 (Ucn3) increases in the PVN (Tanaka et al., 2003; Venihaki et al., 2004), inhibiting animals' feeding behavior by the anorexic properties that these three peptides have in this nucleus (Heinrichs and Richard, 1999; Pellemounter et al., 2004; Stengel and Tache, 2014).

Paradoxically, even when PVN CRH levels remain elevated, animals and humans exposed to chronic stress may develop hyperphagia and obesity (Epel et al., 2001; George et al., 2010; Patterson and Abizaid,

\* Corresponding author at: Department of Neurosciences Research, National Institute of Psychiatry Ramon de la Fuente Muñiz, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, 14370, México D.F., Mexico.

E-mail address: [gortari@imp.edu.mx](mailto:gortari@imp.edu.mx) (P. de Gortari).

2013; Pecoraro et al., 2004), as if stress-involved receptors in the PVN had become resistant to the anorexic effects of CRH. Interestingly, early-life adverse events raise the risk to develop metabolic syndrome and obesity in adulthood (Gooding et al., 2015), particularly when an altered HPA axis regulation develops after chronic stress exposure (Greenfield and Marks, 2009).

The maintenance of high circulating corticosterone levels mobilizes lipids and glucose deposits leading to abdominal obesity as observed in patients with Cushing's syndrome, which curse with chronic elevated serum GC concentration and present visceral fat accumulation, evincing a link between chronic activation of the HPA axis and metabolic alterations (Nieuwenhuizen and Rutters, 2008).

An animal paradigm that mimics neuroendocrine changes of abused or neglected children with long term consequences into adulthood, is the early-life chronic stress induced by maternal separation (MS). When adults, MS rodents develop overfeeding and overweight due to the stress induced by removing dams from the pups' cage for 180 min/daily during postnatal days 2 to 14 (Lee et al., 2007; Ryu et al., 2009).

An impaired function of the HPA axis in MS animals is observed since they do not respond with elevated GC or ACTH levels when subjected to 48 h of fasting or to restraint stress (Daniels et al., 2004; Kim et al., 2005). However, an altered expression of hypothalamic CRH and urocortins or on their receptors in MS animals has not been evaluated. We hypothesized that MS may promote a chronic activation of CRH and Ucn3 synthesis that will induce an impairment of their receptor's signaling, in such a way that their high food intake due to the chronic early-life stress, does not correspond to the known anorexic effects of these peptides.

CRH and the Ucn3s have different affinities for the two identified CRH receptors, CRH-R1 and CRH-R2, being CRH-R2 the main mediator of the anorexic effects of these peptides (Pellemounter et al., 2004; Stengel and Tache, 2014). The PVN is one of the brain regions where CRH-R2 is more expressed than CRH-R1 (Chalmers et al., 1995) and where its activation reduces food intake (de Gortari et al., 2009; Fekete et al., 2007). CRH-R2 signaling is mediated by its coupling to  $G_{\alpha_s}$  protein subunit (Grammatopoulos, 2012), which increases cAMP intracellular levels. Protein kinase A (PKA) is then activated and the concentration of the phosphorylated form of cAMP-response element binding protein (pCREB), rises.

We here investigated whether the high food intake of MS rats was associated with an increased PVN CRH or Ucn3s expression and with an impaired functionality of the CRH-R2 receptor. If this was true, MS could be a good model to analyze the paradoxical hyperphagia of adults with activation of hypothalamic anorexic peptides' pathways due to chronic early stress.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

The Ethics Committee and Project's Commission of the National Institute of Psychiatry approved all animal treatments in compliance with the Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook from the National Institutes of Health from U.S.A. (Office of Laboratory Animal Welfare, 1992).

Pregnant Wistar female rats ( $n = 24$ ) from the institute's (INPRFM) animal's house, were used for the MS experiments, maintained in a 12 h light-dark cycle (07:00–19:00 h), at constant temperature (22 °C), with ad libitum access to water and food (Lab rodent diet # 5001, PMI feeds; Brentwood, MO, USA) up to the end of the experiments.

#### 2.1.1. Maternal separation stress

Delivery date of pregnant rats was considered as postnatal day (PND) 0. Dams ( $n = 12$ ) and their pups were left undisturbed except for the weekly cage cleaning (Control). Male offspring from remaining

dams ( $n = 12$ ) were exposed to MS through the light period from PND 2 to 14. We conducted MS during 180 min/daily, by removing each dam from their home cage and placing them in an adjacent room. All the pups (males and females) from each litter were separated from their dam but maintained together and left in their home cage. During the last week of lactation, both groups were left undisturbed until weaning (PND 21).

In this study we only used the male pups of both groups (4–5/dam, in total  $n = 30$ /group), quantifying their body weight (b.w.) and food intake weekly, from weaning to adulthood (10 weeks old). To measure their food intake, males from both groups (control and MS) were single housed after weaning (Lee et al., 2007), and intake was determined by subtracting the amount of food left by each animal on each week from the pre-weighed chow pellets offered.

On day 71, 12 animals/group were decapitated and brains were excised and stored at  $-70$  °C until dissection of PVNs with a 1.0 mm diameter sample corer, from a coronal slice of frozen brains ( $-1.08$  to  $-3.24$  mm from bregma) (Paxinos and Watson, 2005). We analyzed PVN gene expression of CRH-R1, CRH-R2, CRH, Ucn2, Ucn3 and vasopressin in 5–6 PVN samples/group. Urocortin 1 (Ucn1), a peptide that also reduces food intake, was not analyzed since its expression is scarce in rat and human PVN (Spina et al., 2004). Besides, as trunk blood was collected of the same animals, we analyzed serum corticosterone and vasopressin levels at 12:00 h when those hormones are not increased by the circadian rhythm.

As we found a significant increase in CRH-R2 mRNA expression in MS animals vs. controls, we measured its protein levels in the membrane and cytosolic cell fractions of PVN by western blot in the remaining 5–6 rats/group in order to define whether changes on its gene expression correlated with those of its protein levels in MS group.

#### 2.1.2. Intra-PVN injection of Ucn2 in MS and control animals

The remaining 36–40 animals were cannulated into the PVN to evaluate CRH-R2 functionality. To that end, we injected Ucn2 intra-PVN, because Ucn2 is the CRH-R2 ligand with the highest affinity (Pellemounter et al., 2004) and its synthesis was greater in MS than in controls.

Rats from both groups weighing 280–320 g were anesthetized with 100 mg/kg of Ketamine (Anesket, PISA agropecuaria, Guadalajara Jal. México) and 10 mg/kg of intramuscular Xylazine (Procin, PISA Agropecuaria, Guadalajara Jal. México). After being placed in a stereotaxic apparatus rats were unilaterally implanted with a stainless steel guided cannula (20-gauge, BD medical, Franklin Lakes NJ USA), secured 3.2 mm above the PVN (from bregma, anteroposterior (AP):  $-1.1$ ; L:  $+0.2$ ; dorsal ventral (DV):  $-4$  from the skull) (Paxinos and Watson, 2005); reaching the DV:  $-7.2$  mm with the injector. After five days of recovery, food intake was normalized. At this point, animals received 0.7  $\mu$ g/0.5  $\mu$ L of mUcn2 (mouse Ucn2, Sigma-Aldrich San Luis MO USA) or 0.5  $\mu$ L of vehicle (NaCl solution 0.9%) intra-PVN and 4 groups were formed: C-Veh, C-Ucn2, MS-Veh and MS-Ucn2 ( $n = 9$ –10/subgroup).

We measured their food intake ( $n = 10$ /subgroup) during the next 24 h after injection; we verified cannula and injector trajectories in brains of those animals by staining 60  $\mu$ m brain slices from bregma-0.84 mm to bregma  $-2.04$  mm (Paxinos and Watson, 2005) with Nissl's cresyl violet.

A different set of animals from both groups (12/group) were also cannulated and treated as described above but were sacrificed 10 min after receiving the intra-PVN administration of Ucn2 or vehicle ( $n = 6$ /subgroup) to determine their CREB and phosphorylated-CREB (pCREB) levels in this hypothalamic nucleus.

#### 2.1.3. Intra-PVN injection of CRH-R2 specific antagonist in control adults

We injected 2 different doses of antisauvagine-30 (ASV30, 3 or 30 nmol) or saline into the PVN of adult control rats to identify changes in CRH-R2 mRNA expression due to its blockage. We injected male Wistar adults ( $n = 4$ /group/dose or saline) with 100 mg/kg of Ketamine

(Anesket, PISA agropecuaria, Guadalajara Jal. México) and 10 mg/kg of intramuscular Xylazine (Procin, PISA agropecuaria, Guadalajara Jal. México) before placing the animal in a stereotaxic apparatus and injected 1  $\mu$ L of the solutions (ASV30 diluted in 0.9% saline) with a 10  $\mu$ L Hamilton syringe (Hamilton Company, Reno NV, USA). The stereotaxic coordinates to the PVN are: AP:  $-1.1$  mm from bregma; L:  $+0.2$  from the mid-line; DV:  $-7.2$  from the skull according to the brain atlas from Paxinos and Watson (Paxinos and Watson, 2005). After 2 h of the injection, animals were sacrificed and PVN dissected from excised brains to measure CRH-R2 mRNA expression by real-time PCR.

## 2.2. Serum hormone analyses

Rat serum corticosterone was measured in adults from control and MS groups with a Coat-a-Count Radioimmunoassay (RIA) kit (Siemens Medical Solutions Diagnostics, Los Angeles, CA, USA); limit of detection, 5.7 ng/mL; inter and intra-assay variation, 8.5 and 6.8%, respectively. We used the Arg8-Vasopressin ELISA kit (ENZO Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) to analyze serum vasopressin concentration in control and MS groups (first experiment). Limit of detection, 3.39 pg/mL; inter and intra-assay variation, 8.5 and 10.6%, respectively.

## 2.3. mRNA quantification by real time polymerase chain reaction (PCR)

Frozen PVN dissected were homogenized in 4 M guanidine thiocyanate (ICN, Aurora, OH, USA) to obtain total RNA as described (Chomczynski and Sacchi, 1987). RNA quality was confirmed by O.D. absorbancies of 260/280 and 260/230 nm ratios and by quantifying the 28S/18S ratio using agarose gel electrophoresis. Extraction was considered optimal when ratios were larger than 1.8 (Arechiga-Ceballos et al., 2014).

We quantified PVN CRH-R1, CRH-R2, CRH, Ucn2, Ucn3 and vasopressin mRNA levels by real-time polymerase chain reaction (PCR). PVN cDNA was prepared as described (Arechiga-Ceballos et al., 2014). Total RNA (1.5  $\mu$ g) transcribed with 100 U M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 500 ng of oligo-dT (Biotechnologías Universitarias, UNAM, México).

We used the Applied Biosystems 7500 real-time PCR system and Taqman probes (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) for vasopressin (Rn00690189\_g1), CRH-R1 (Rn00578611\_m1), CRH-R2 (Rn00575617\_m1), CRH (Rn01462137), Ucn2 (Rn00591306\_s1), Ucn3 (Rn02091611\_s1) and for  $\beta$ -actin (4352931E *Actb*, control gene). Quantified mRNA levels were normalized using the  $\Delta\Delta$ Ct method; the threshold cycle (Ct) with  $\Delta$ Ct = Ct problem – Ct *Actb* equation. The fold-change of mRNA expression was calculated by the expression:  $2^{-(\Delta$ Ct of experimental group –  $\Delta$ Ct of Control).

## 2.4. CRH-R2, CREB and phosphorylated-CREB expression in PVN of MS and control rats analyzed by western blot

Reagents used were from Sigma-Aldrich (San Luis MO, USA) or JT Baker (Center Valley, PA, USA). PVN samples of adult control or MS rats were homogenized in a 100  $\mu$ L mixture of: EDTA buffer (50 mM TrisHCl, 50 mM EDTA, 1% SDS and 50 mM NaCl), 10% sucrose, protease (complete mini, Roche Indianapolis, IN, USA) and phosphatase inhibitors (PhosSTOP, Roche Indianapolis, IN, USA). After maintained 25 min at 4 °C, samples were centrifuged at 12000 rpm by 60 min at 4 °C. Supernatant (cytosolic phase) was separated and the pellet homogenized in a 50  $\mu$ L mixture of: EDTA buffer, 1% sodium deoxycholate, Nonidet P-40, protease and phosphatase inhibitors. Samples were maintained at 4 °C during 60 min before being centrifuged at 12000 rpm by 60 min at 4 °C, and supernatants collected (membrane phase).

From both supernatants (cytosolic and membrane extracts) we took an aliquot of 1  $\mu$ L and diluted it 1:100 in distilled water for protein determination by the folin-phenol reagent method (Lowry et al., 1951). The remaining supernatant was diluted 1:1 with 2 $\times$  Laemmli buffer (Tris

0.5 M pH 6.8, SDS 10%, glycerol, mercaptoethanol and bromophenol blue), denatured during 3 min on boiling water and centrifuged at 13800 rpm by 10 min at 4 °C.

Twenty micrograms of protein were added from each sample, and the sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed on a standard system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using a 10% polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to Hybond-C nitrocellulose membranes (Amersham Life Science, NJ, USA), and blocked using 5% albumin in PBS 1 $\times$ . Membranes were then incubated for 48 h at 4 °C with the primary antibodies for CRH-R2 (1:250 Abcam, Cambridge, MA, USA), or CREB and pCREB 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). In order to normalize protein extracted from cytosol, samples were incubated with an antibody for actin 1:200 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) whereas membrane extracts incubated with an antibody for the ecto-5'-nucleotidase (E5NT) 1:200, (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Nitrocellulose membranes were then incubated with secondary antibodies [horseradish peroxidase-conjugated goat or bovine antibodies to rabbit 1:2000 (Abcam, Cambridge, MA, USA) or goat 1:2000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA)] for 1 h at 22 °C. After three washes with PBS 1 $\times$ -Tween 20 solution, the chemiluminescent immunoreactive bands were visualized using luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) and exposed to photographic films (Kodak Biomax MR Rochester, NY, USA), which were developed to quantify bands' optical densities using the Image J software.

## 2.5. Statistical analysis

Comparison of food intake and b.w. gain between control and MS rats was performed by ANOVA of repeated measures. Differences in PVN genes or protein expression, corticosterone and vasopressin levels between control and MS groups, were obtained by a Student's *t*-test. Analysis of CRH-R2 mRNA levels in the PVN of adult control animals injected with ASV30 was performed by one-way ANOVA. Comparisons of food intake and of CREB expression levels after Ucn2 or vehicle intra-PVN injection between MS and control animals were analyzed by a two-way ANOVA (control or MS and solution injection). When significant  $P < 0.05$ , a Fisher's post-hoc test was performed using the Stat-View software (SAS Institute Cary, NC USA).

## 3. Results

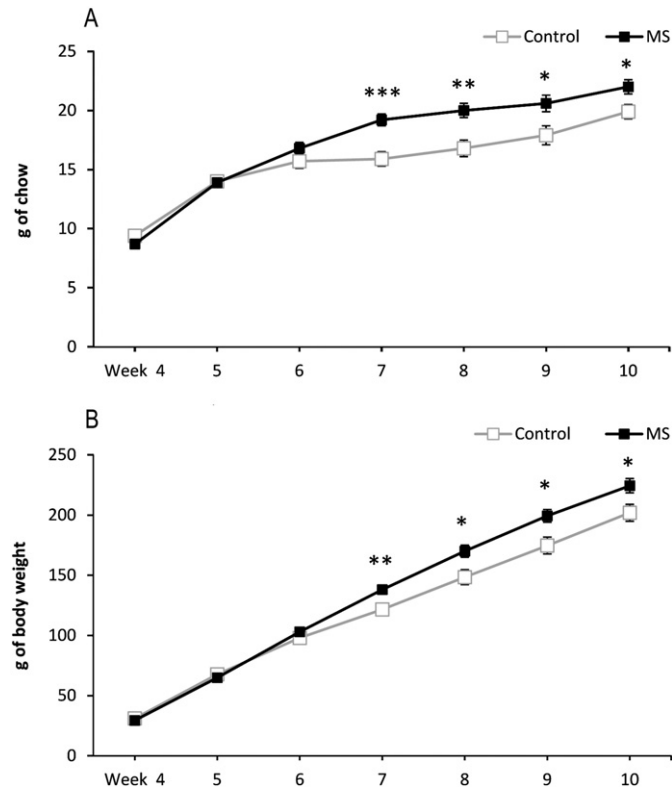
### 3.1. Food intake and body weight gain of MS and control adult rats

MS rats showed higher food intake than controls of approximately 16% from week 7, which was maintained up to the end of the experiment (Fig. 1A). ANOVA of repeated measures showed an effect of MS:  $F_{(1,57)} = 4.337, P < 0.05$ ; time:  $F_{(6,342)} = 167.407, P < 0.0001$  and interaction between variables:  $F_{(6,342)} = 6.806, P < 0.001$ .

B.w. of weaning rats was similar between both groups, but on week 7 MS rats had approximately 13% more b.w. gain vs. controls, a difference that remained until week 10 (Fig. 1B). ANOVA of repeated measures showed an effect of MS  $F_{(1,55)} = 4.759, P < 0.05$ ; time:  $F_{(6,330)} = 1041.997, P < 0.0001$  and interaction between those variables:  $F_{(6,330)} = 8.491, P < 0.0001$ .

### 3.2. Hormones' serum levels in adult control and MS rats

At 10 weeks old, corticosterone serum levels of MS rats increased (157%) vs. that of control group  $t = -2.312, P < 0.05$ . At the same time, a two-fold increase in circulating vasopressin occurred in MS animals vs. controls,  $t = -3.728, P < 0.01$  (Table 1).



**Fig. 1.** Food intake and body weight (b.w.) gain of control and MS rats ( $n = 25\text{--}32/\text{group}$ ). (A) Values are the mean  $\pm$  SEM of grams of food eaten by control and MS groups daily. (B) B.w. gain of control and MS rats from weaning and up to adulthood, expressed as grams of b.w. gained by the animal each week, subtracting their weight at PND 21 (weaning). Values are the mean  $\pm$  SEM of grams of b.w. gained. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group.

### 3.3. PVN gene's expression in adult MS and control animals

We found that PVN mRNA levels of vasopressin, CRH, Ucn2 and those of CRH-R2 increased in MS vs. control rats (Student's  $t$ -test for vasopressin:  $t = -9.004$ ,  $P < 0.001$ ; CRH:  $t = -3.045$ ,  $P < 0.05$ ; for Ucn2:  $t = -7.169$ ,  $P < 0.001$  and for CRH-R2:  $t = -2.801$ ,  $P < 0.05$ ). In contrast, CRH-R1 expression decreased in MS animals ( $t = 3.279$ ,  $P < 0.05$ ) and that of Ucn3 was not different between groups ( $n = 5\text{--}6/\text{group}$ ) (Fig. 2A).

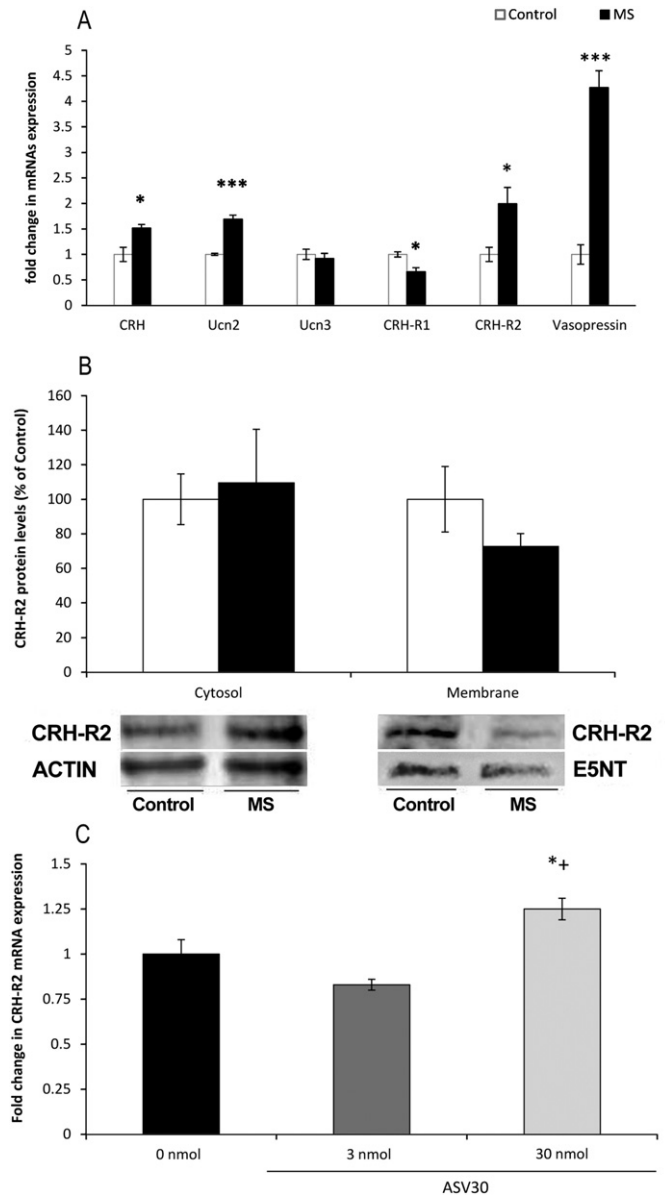
### 3.4. Protein expression levels of CRH-R2 in cytosolic and membrane compartments of PVN

We did not find any change in CRH-R2 protein expression levels in the cytosolic fraction between groups; in contrast, a tendency to decrease was observed in PVN cell membranes of MS group when compared to controls, but the difference was not significant (Fig. 2B).

**Table 1**

Serum hormone concentrations in adult control and maternally separated (MS) animals. Values are the mean  $\pm$  SEM of serum corticosterone (ng/mL) and vasopressin (pg/mL) concentrations, ( $n = 6/\text{group}$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control group.

	Corticosterone (ng/mL)	Vasopressin (pg/mL)
Control	382.5 $\pm$ 73	69 $\pm$ 8
MS	598.7 $\pm$ 57*	145 $\pm$ 20**



**Fig. 2.** PVN expression of CRH-related genes by real time PCR and CRH-R2 protein levels, by western blot analysis. (A) Schematic representation of CRH, Ucn2, Ucn3, CRH-R1, CRH-R2 and vasopressin mRNA expression, normalized to actin gene expression ( $n = 5\text{--}6/\text{group}$ ). Values represented are the mean  $\pm$  SEM and are expressed as fold changes of gene expression compared to control group values. (B) Representation of CRH-R2 protein levels in the cytosolic and membrane fraction of the PVN; protein expression was normalized to that of actin and in the membrane to that of E5NT (ecto-5'-nucleotidase) ( $n = 6/\text{group}$ ). Values represented are the mean  $\pm$  SEM of the optical density of CRH-R2 band/control density protein and are expressed as % of control values (= 100%). (C) CRH-R2 gene expression normalized to actin levels in adult control rats intra-PVN injected with ASV30 ( $n = 4/\text{group}$ ). Depicted values are the mean  $\pm$  SEM and are expressed as fold changes of gene expression compared to 0 nmol/ $\mu\text{L}$  group values. Panel A: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs. control group, Panel B: \* $P < 0.05$  vs. 0 nmol/ $\mu\text{L}$  group, + $P < 0.01$  vs. 3 nmol/ $\mu\text{L}$  group.

### 3.5. CRH-R2 mRNA expression after the injection of ASV30 in the PVN of control adults

In order to define an association between CRH-R2 functionality and its gene expression, we injected the specific antagonist ASV30 in the PVN of unstressed control adult rats. An increase in CRH-R2 gene expression was observed by the intra-PVN administration of 30 nmol of the antagonist ASV30 compared to that of saline and 3 nmol injected

animals,  $F_{(2,11)} = 7.114$ ,  $P < 0.05$ . The low dose used did not promote CRH-R2 expression changes vs. saline administered rats (Fig. 2C).

### 3.6. Effect of an intra-PVN injection of Ucn2 or vehicle on 24 h food intake of MS and control animals.

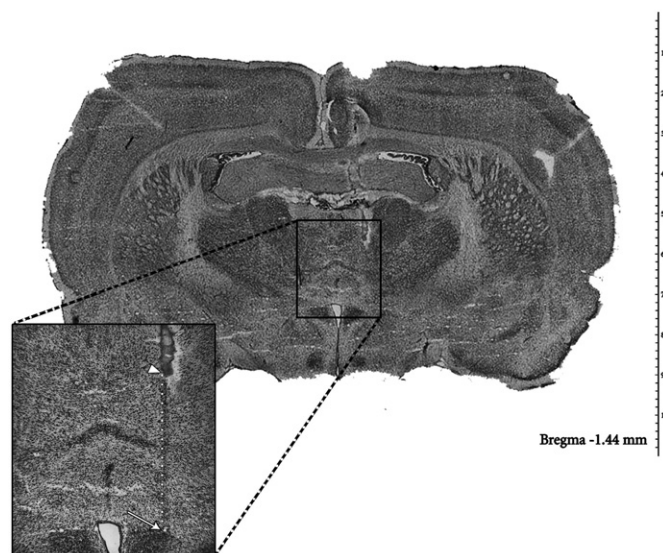
We administered Ucn2 or vehicle in MS and control animals through a cannula inserted in the PVN (its trajectory is shown in a 60  $\mu\text{m}$  brain slice stained with cresyl violet (Fig. 3)). As expected, adult control rats administered with the CRH-R2 agonist (C-Ucn2) into the PVN, showed a 25% lower food intake during the next 24 h after injection, compared to vehicle-injected group (C-Veh). In contrast, MS-Ucn2 did not show the feeding reduction observed in C-Ucn2 animals. The percentages of food eaten 24 h after injection were analyzed by two-way ANOVA revealing effect of MS  $F_{(1,39)} = 5.023$ ,  $P < 0.05$  and of treatment (Ucn2 or veh injection)  $F_{(1,39)} = 4.095$ ,  $P < 0.05$  (Fig. 4A).

### 3.7. Phosphorylation of CREB protein by Ucn2 or vehicle injection into the PVN of MS and control adult rats

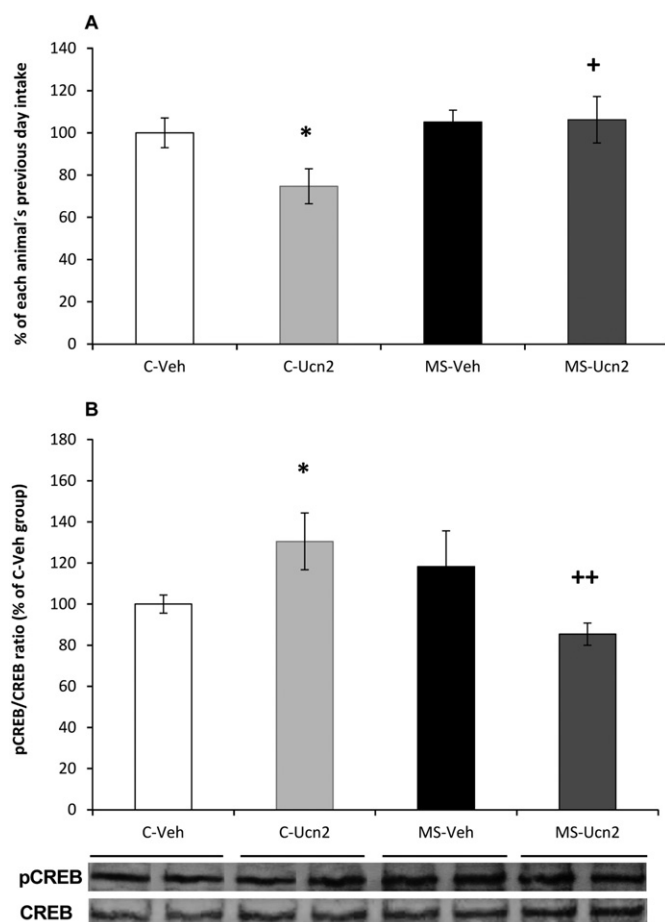
We compared the ratio between pCREB/CREB protein expression levels between control and MS rats after an intra-PVN injection with Ucn2 or vehicle. Interestingly, we found a significant interaction between groups and treatments in pCREB/CREB levels  $F_{(1,22)} = 9.19$ ,  $P < 0.01$ . Only C-Ucn2 animals showed increased pCREB/CREB ratio due to the activation of CRH-R2 when compared to that of C-Veh group; MS-Ucn2 in contrast did not show any increment vs. MS-Veh or C-Veh (Fig. 4B).

## 4. Discussion

An association between obesity or overweight development due to high food intake and hyperactivity of the HPA axis induced by chronic stress exposure early in life, has been described in rodents and humans (Greenfield and Marks, 2009; Lee et al., 2007; Ryu et al., 2009). In the present study we analyzed in early maternal separated adults, the mRNA expression of stressed-related hypothalamic PVN neuropeptides CRH, Ucn2 and that of its receptors, which are known to modulate eating behavior. In our early-life chronically-stress animal model we found increased b.w. gain and food intake in 10-week old male MS rats. This



**Fig. 3.** A coronal brain slice showing an example of the cannula (arrowhead) and injector trajectory, plus the placement of the injection site (arrow) within the medial parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN).



**Fig. 4.** Food intake and phosphorylated-CREB in MS and control animals injected with Ucn2 or vehicle into the PVN. (A) Cumulative food intake of adult animals during the next 24 h after being injected with vehicle (C-Veh and MS-Veh) or Ucn2 (C-Ucn2 and MS-Ucn2) ( $n = 10/\text{group}$ ). Values represent the percentage of food eaten by each animal compared to the amount of food consumed the day previous to the injection (100%). Figure shows the mean  $\pm$  SEM of the percentage of food eaten by each group when control values are considered as 100%. (B) Representation of PVN pCREB levels normalized by those of CREB 10 min after vehicle or Ucn2 administration into the PVN of both groups ( $n = 6/\text{group}$ ). Values are the mean  $\pm$  SEM of the optical density of pCREB band/CREB ratio and are expressed as % of control values (C-Veh = 100%); \* $P < 0.05$  vs. C-Veh; +  $P < 0.05$ , ++  $P < 0.01$  vs. C-Ucn2.

long-term effect of MS on feeding and body weight regulation has already been described (Lee et al., 2007; Ryu et al., 2009; Vargas et al., 2016).

Interestingly the MS effect on overweight and overfeeding development in adulthood is only observed when the separated animals are raised in isolation from weaning (Ryu et al., 2009; Vargas et al., 2016), which evinces the need of the synergistic impact of the two chronic stressors. The sole isolation after weaning may induce no effect in body weight or food intake (Ryu et al., 2009) or can promote hyperphagia in control rats when compared to naïve animals raised in groups (Nakhate et al., 2011). These findings support that our control animals that were isolated are the adequate control group to evince the overconsumption induced by MS (raised in isolation).

Changes that we found on the HPA axis parameters of MS group seemed also to be exclusive of animals that were exposed to both stressors. For example, our MS group showed HPA axis hyperactivity, which was evinced by their higher basal corticosterone serum levels along with their increased CRH mRNA expression in the PVN, when compared to controls. This implied an impaired negative feedback effect of GC on PVN CRH synthesis, which is frequently described in chronically stressed individuals and that contrasts with the HPA response in healthy controls whose GC are able to down-regulate PVN CRH

expression (Makino et al., 1995); furthermore, this altered function of the HPA axis is associated with the development of different mood and feeding disorders including anxiety and hyperphagia in rodents and humans (Epel et al., 2001; Greenfield and Marks, 2009; Lee et al., 2007; Ryu et al., 2009).

This hyperactive HPA is not responding with a further increase in corticosterone serum levels when subjected to a new challenge, thus it is considered hypo-responsive (Biggio et al., 2014; Daniels et al., 2004; Kim et al., 2005). Such changes on the HPA axis of our MS rats were contrasting with the ones described in group-raised MS and in isolated-control animals. Sole isolation is known to induce hyperactivity of the HPA axis (greater rises in corticosterone serum levels than grouped controls) when animals are subjected to a foot shock (Biggio et al., 2014). This is in line with our observations in controls showing high corticosterone but normal expression levels of CRH in the PVN that are in accordance with a responsive HPA axis. Similarly, group-raised MS animals may present a normal response (similar to grouped-controls) (Biggio et al., 2014) or a hyper-responsive HPA axis after an airpuff startle (Plotsky et al., 2005). All these results evinced that MS or isolation alone seem not enough to induce the low activity of the HPA axis found here in the MS group.

High basal vasopressin mRNA expression was also evidence of the chronic stress effects on HPA axis function of MS animals given that AVP is the main parvocellular regulator of circulating corticosterone in chronic stress-exposed animals (Aguilera et al., 2008; Makino et al., 1995). The increased vasopressin levels of our MS group vs. controls were due to the additive effects of both stressors (MS and isolation).

The low PVN CRH-R1 expression found in MS animals seemed also to be a consequence of repetitive stress stimuli, given that after an acute restraint session the expression increases and depending on the nature of the challenge, it may remain unchanged (Bonaz and Rivest, 1998). The high expression of CRH during a chronic stress might be involved in the decrease of CRH-R1, since CRH-overexpressing mice present a down-regulation of CRH-R1 mRNA in different subcortical brain regions like the subthalamic nucleus, globus pallidus, *substantia nigra* and lateral septum (Korosi et al., 2006). High CRH and decreased CRH-R1 expression of our MS group vs. controls seemed also exclusive of the combination of MS and isolation, since isolated female controls show normal CRH-R1 along with higher expression of CRH in the PVN (Pournajafi-Nazarloo et al., 2009). Therefore, the high CRH found in MS animals seemed to be much higher than the caused by isolation alone.

A differential effect of sole MS vs. MS-isolated rats on PVN CRH-R2 expression was also observed. MS animals here showed an up-regulation of the type-2 receptor, whereas it does not change in group-raised MS controls (Plotsky et al., 2005). Again, this result reinforces the apparent differential impact of the combination of MS and isolation on HPA axis that leads to specific behavioral changes in MS animals.

Besides CRH, MS adult rats showed enhanced PVN Ucn2 expression. When injected i.c.v., this peptide is a stress-related hypothalamic factor with anorexic actions (Stengel and Tache, 2014). Therefore, the increased CRH and Ucn2 mRNA expression seemed paradoxical and incompatible with the hyperphagia displayed by MS group.

It is challenging to discern which factors could be involved in the elevated synthesis of Ucn2 in the PVN of MS animals; a plausible cause could be their higher circulating corticosterone levels since an acute peripheral administration of dexamethasone or an immobilization stress session increase it in the hypothalamus (Tanaka et al., 2003). Another possible factor could be the elevated CRH observed in MS adults, which is supported by in vitro studies showing that CRH addition to cultured pituitary cells up-regulates Ucn2 mRNA levels and stimulates its release (Nemoto et al., 2007). However, effects of a chronic CRH elevation on Ucn2 synthesis' regulation have not been described.

We cannot be conclusive about the reason as to why the Ucn3 synthesis was not affected by MS in PVN of adult rats. In the whole hypothalamus (not specifically in the PVN), Ucn3 mRNA expression

increases when rats are subjected to psychosocial stress paradigm during 5 days (Ataka et al., 2012) or to an acute restraint stress (van-Hover and Li, 2015; Venihaki et al., 2004); adrenalectomy is also a stimulus that increases Ucn3 expression in the rostral perifornical hypothalamus but not in the PVN (Jamieson et al., 2006). Even if the effects of chronic stress on PVN Ucn3 expression have not been evaluated yet, our results indicated that chronic elevation in GC did not modify its synthesis. Another possibility is that as the controls were stressed by isolation, they might have presented also an increased Ucn3 expression, which avoided us to identify an increase in the MS group.

We did not evaluate Urocortin 1 (Ucn1) mRNA content, since it is barely expressed in the PVN (Spina et al., 2004), thus it does not seem a likely mediator of stress-induced food intake regulation in the PVN. We focused here in the analysis of CRH's system peptides and receptors expressed in the PVN, a region that is able to direct the response to energy demands of a stressful situation and to modulate feeding behavior accordingly, given that it receives information from peripheral signals and from other hypothalamic nuclei (Konturek et al., 2005; van-Hover and Li, 2015). The anorexic effect of CRH-R2 activation in the VMH is well known (Stengel and Tache, 2014), but the receptor is highly expressed in the PVN and it also mediates feeding behavior effects of Ucn2 and CRH by being released in an autocrine or paracrine manner (Fekete et al., 2007; Hashimoto et al., 2004). For this reason, it was not unlikely that the sustained ligand's elevation found in adult MS animals could be constantly stimulating CRH-R2, which is the receptor (not CRH-R1) that mediates the anorexic effects of both peptides in the PVN (Fekete et al., 2007). Therefore, the CRH-R2 functionality of MS group might be impaired as a compensatory desensitization to a sustained binding and activation by its ligands. If true, this CRH-R2 impaired function could promote hyperphagia in MS group.

We observed an upregulation of CRH-R2 expression in control unstressed animals after being administered with the specific antagonist ASV30 into the PVN. This pointed to an association between blocked functionality of the receptor along with an increased mRNA content, supporting that the higher expression observed in PVN of MS adult rats might be indicating an impairment of its signaling. In fact, this is in agreement with the decreased CRH-R2 mRNA levels in PVN showed by animals with a feeding-avoiding behavior (de Gortari et al., 2009).

To discern whether MS induced internalization of the CRH-R2 protein in the PVN, we compared its cellular expression levels, and found that it slightly decreased in the membrane fraction with no change in the cytoplasm. This might result from a more active degradation of the receptor in MS animals than in controls, which is a process known to stimulate the synthesis of some receptors (Reyes et al., 2008) and was in accordance to the higher CRH-R2 mRNA levels found in MS group. Another plausible explanation is that a non-coding micro RNA (miRNA) or an RNA binding protein (like vimentin) could be repressing the CRH-R2 mRNA translation, as happens for other receptors such as the  $\mu$ -opioid receptor (MOR) (Song et al., 2013; Wu et al., 2009). It is important to mention that the MS paradigm promotes increases in miRNAs expression in different brain regions like the nucleus accumbens, medial prefrontal cortex and the hippocampus and that these increases are related to the down-regulation of dopamine and serotonin receptors' protein expression (Bai et al., 2014; Zhang et al., 2013).

However, in order to corroborate receptor's desensitization in MS rats we injected Ucn2 intra-PVN to evaluate its ability to induce anorexic effects and to increase pCREB levels. We decided to inject Ucn2 because of its greater affinity for CRH-R2 than that of CRH [by 75–100 times (Hoare et al., 2005)]. Ucn2 was unable to reduce feeding or to increase pCREB/CREB protein ratio in MS animals, which contrasted with the evident effect on Ucn2-injected controls; these results are in agreement with an ex vivo study showing the inability of Ucn2 to increase the firing rate of PVN neurons in hypothalamic slices from early-postnatal overfed and overweighted animals, as opposed to the stimulating effects on brain slices of control rats (Davidowa and Plagemann, 2004).



Insensitivity of different membrane receptors by sustained contact of its ligands is not uncommon. Interestingly, overfeeding has been associated to hypothalamic receptors' insensitivity, which impairs hormone's anorexic effects such as those of leptin (Lin et al., 2000; Page et al., 2009) and melanocortins (Gout et al., 2008). An altered receptor's signaling and its increased hypothalamic expression may result by constant stimulation of its ligand (Lin et al., 2000; Page et al., 2009), as well as, by interactions between altered function of anorexic systems (Gout et al., 2008). Thus, it is not unlikely that CRH-R2 impaired functionality due to sustained binding of its ligands induced increased b.w. and food intake in MS animals.

## Funding

This work was supported by CONACYT [233918].

## Acknowledgements

We want to thank M.S. Cinthia García-Luna for her help with staining technique and to Raúl Cardoso and Jose Luis Calderón for their help with drawings.

## References

- Aguilera, G., Subburaju, S., Young, S., Chen, J., 2008. The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog. Brain Res.* 170, 29–39.
- Arechiga-Ceballos, F., Alvarez-Salas, E., Matamoros-Trejo, G., Amaya, M.I., Garcia-Luna, C., de Gortari, P., 2014. Pro-TRH and pro-CRF expression in paraventricular nucleus of small litter-reared fasted adult rats. *J. Endocrinol.* 221, 77–88.
- Ataka, K., Nagaishi, K., Asakawa, A., Inui, A., Fujimiya, M., 2012. Alteration of antral and proximal colonic motility induced by chronic psychological stress involves central urocortin 3 and vasopressin in rats. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303, G519–G528.
- Bai, M., Zhu, X.Z., Zhang, Y., Zhang, S., Zhang, L., Xue, L., Zhong, M., Zhang, X., 2014. Anhedonia was associated with the dysregulation of hippocampal HTR4 and microRNA Let-7a in rats. *Physiol. Behav.* 129, 135–141.
- Biggio, F., Pisu, M.G., Garau, A., Boero, G., Locci, V., Mostallino, M.C., Olla, P., Utzeri, C., Serra, M., 2014. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 1152–1161.
- Bonaz, B., Rivest, S., 1998. Effect of a chronic stress on CRF neuronal activity and expression of its type 1 receptor in the rat brain. *Am. J. Phys.* 275, R1438–R1449.
- Chalmers, D.T., Lovenberg, T.W., De Souza, E.B., 1995. Localization of novel corticotropin-releasing factor receptor (CRF2) mRNA expression to specific subcortical nuclei in rat brain: comparison with CRF1 receptor mRNA expression. *J. Neurosci.* 15, 6340–6350.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Daniels, W.M., Pietersen, C.Y., Carstens, M.E., Stein, D.J., 2004. Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab. Brain Dis.* 19, 3–14.
- Davidow, H., Plagemann, A., 2004. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. *Neurosci. Lett.* 371, 64–68.
- de Gortari, P., Mancera, K., Cote-Velez, A., Amaya, M.I., Martinez, A., Jaimes-Hoy, L., Joseph-Bravo, P., 2009. Involvement of CRH-R2 receptor in eating behavior and in the response of the HPT axis in rats subjected to dehydration-induced anorexia. *Psychoneuroendocrinology* 34, 259–272.
- Epel, E., Lapidus, R., McEwen, B., Brownell, K., 2001. Stress may add bite to appetite in women: a laboratory study of stress-induced cortisol and eating behavior. *Psychoneuroendocrinology* 26, 37–49.
- Fekete, E.M., Inoue, K., Zhao, Y., Rivier, J.E., Vale, W.W., Szucs, A., Koob, G.F., Zorrilla, E.P., 2007. Delayed satiety-like actions and altered feeding microstructure by a selective type 2 corticotropin-releasing factor agonist in rats: intra-hypothalamic urocortin 3 administration reduces food intake by prolonging the post-meal interval. *Neuropsychopharmacology* 32, 1052–1068.
- George, S.A., Khan, S., Briggs, H., Abelson, J.L., 2010. CRH-stimulated cortisol release and food intake in healthy, non-obese adults. *Psychoneuroendocrinology* 35, 607–612.
- Gooding, H.C., Milliren, C., Austin, S.B., Sheridan, M.A., McLaughlin, K.A., 2015. Exposure to violence in childhood is associated with higher body mass index in adolescence. *Child Abuse Negl.* 50, 151–158.
- Gout, J., Sarafian, D., Tirard, J., Blondet, A., Vigier, M., Rajas, F., Mithieux, G., Begeot, M., Naville, D., 2008. Leptin infusion and obesity in mouse cause alterations in the hypothalamic melanocortin system. *Obesity (Silver Spring)* 16, 1763–1769.
- Grammatopoulos, D.K., 2012. Insights into mechanisms of corticotropin-releasing hormone receptor signal transduction. *Br. J. Pharmacol.* 166, 85–97.
- Greenfield, E.A., Marks, N.F., 2009. Violence from parents in childhood and obesity in adulthood: using food in response to stress as a mediator of risk. *Soc. Sci. Med.* 68, 791–798.
- Hashimoto, K., Nishiyama, M., Tanaka, Y., Noguchi, T., Asaba, K., Hossein, P.N., Nishioka, T., Makino, S., 2004. Urocortins and corticotropin releasing factor type 2 receptors in the hypothalamus and the cardiovascular system. *Peptides* 25, 1711–1721.
- Heinrichs, S.C., Richard, D., 1999. The role of corticotropin-releasing factor and urocortin in the modulation of ingestive behavior. *Neuropeptides* 33, 350–359.
- Hoare, S.R., Sullivan, S.K., Fan, J., Khongsaly, K., Grigoriadis, D.E., 2005. Peptide ligand binding properties of the corticotropin-releasing factor (CRF) type 2 receptor: pharmacology of endogenously expressed receptors, G-protein-coupling sensitivity and determinants of CRF2 receptor selectivity. *Peptides* 26, 457–470.
- Jamieson, P.M., Li, C., Kukura, C., Vaughan, J., Vale, W., 2006. Urocortin 3 modulates the neuroendocrine stress response and is regulated in rat amygdala and hypothalamus by stress and glucocorticoids. *Endocrinology* 147, 4578–4588.
- Kim, H.J., Lee, J.H., Choi, S.H., Lee, Y.S., Jahng, J.W., 2005. Fasting-induced increases of arcuate NPY mRNA and plasma corticosterone are blunted in the rat experienced neonatal maternal separation. *Neuropeptides* 39, 587–594.
- Konturek, P.C., Konturek, J.W., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T., Sito, E., Konturek, S.J., 2005. Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications. *J. Physiol. Pharmacol.* 56 (Suppl. 6), 5–25.
- Korosi, A., Veening, J.G., Kozicz, T., Henckens, M., Dederen, J., Groenink, L., van der Gugten, J., Olivier, B., Roubos, E.W., 2006. Distribution and expression of CRF receptor 1 and 2 mRNAs in the CRF over-expressing mouse brain. *Brain Res.* 1072, 46–54.
- Lee, J.H., Kim, H.J., Kim, J.G., Ryu, V., Kim, B.T., Kang, D.W., Jahng, J.W., 2007. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neurosci. Res.* 58, 32–39.
- Lin, S., Storlien, L.H., Huang, X.F., 2000. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res.* 875, 89–95.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., Randall, R., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265–275.
- Makino, S., Smith, M.A., Gold, P.W., 1995. Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology* 136, 3299–3309.
- Nakhate, K.T., Kokare, D.M., Singru, P.S., Subhedar, N.K., 2011. Central regulation of feeding behavior during social isolation of rat: evidence for the role of endogenous CART system. *Int. J. Obes.* 35, 773–784.
- Nemoto, T., Iwasaki-Sekino, A., Yamauchi, N., Shibasaki, T., 2007. Regulation of the expression and secretion of urocortin 2 in rat pituitary. *J. Endocrinol.* 192, 443–452.
- Nieuwenhuizen, A.G., Rutters, F., 2008. The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol. Behav.* 94, 169–177.
- Office of Laboratory Animal Welfare, 1992. Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook (Bethesda, MD).
- Page, K.C., Malik, R.E., Ripple, J.A., Anday, E.K., 2009. Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. *Am. J. Phys. Regul. Integr. Comp. Phys.* 297, R1049–R1057.
- Patterson, Z.R., Abizaid, A., 2013. Stress induced obesity: lessons from rodent models of stress. *Front. Neurosci.* 7, 1–20.
- Paxinos, G., Watson, C., 2005. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. ELSEVIER Academic Press, Burlington.
- Pecoraro, N., Reyes, F., Gomez, F., Bhargava, A., Dallman, M.F., 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 145, 3754–3762.
- Pelleymounter, M.A., Joppa, M., Ling, N., Foster, A.C., 2004. Behavioral and neuroendocrine effects of the selective CRF2 receptor agonists urocortin II and urocortin III. *Peptides* 25, 659–666.
- Plotsky, P.M., Thirivikraman, K.V., Nemeroff, C.B., Caldji, C., Sharma, S., Meaney, M.J., 2005. Long-term consequences of neonatal rearing on central corticotropin-releasing factor systems in adult male rat offspring. *Neuropsychopharmacology* 30, 2192–2204.
- Pournajafi-Nazarloo, H., Partoo, L., Sanzenbacher, L., Paredes, J., Hashimoto, K., Azizi, F., Sue, C.C., 2009. Stress differentially modulates mRNA expression for corticotropin-releasing hormone receptors in hypothalamus, hippocampus and pituitary of prairie voles. *Neuropeptides* 43, 113–123.
- Reyes, B.A., Valentino, R.J., Van Bockstaele, E.J., 2008. Stress-induced intracellular trafficking of corticotropin-releasing factor receptors in rat locus coeruleus neurons. *Endocrinology* 149, 122–130.
- Ryu, V., Yoo, S.B., Kang, D.W., Lee, J.H., Jahng, J.W., 2009. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Res.* 1295, 127–134.
- Song, K.Y., Choi, H.S., Law, P.Y., Wei, L.N., Loh, H.H., 2013. Vimentin interacts with the 5'-untranslated region of mouse mu opioid receptor (MOR) and is required for post-transcriptional regulation. *RNA Biol.* 10, 256–266.
- Spina, M.G., Langnaese, K., Orlando, G.F., Horn, T.F., Rivier, J., Vale, W.W., Wolf, G., Engelmann, M., 2004. Colocalization of urocortin and neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamus and Edinger-Westphal nucleus of the rat. *J. Comp. Neurol.* 479, 271–286.
- Stengel, A., Tache, Y., 2014. CRF and urocortin peptides as modulators of energy balance and feeding behavior during stress. *Front. Neurosci.* 8, 52.
- Tanaka, Y., Makino, S., Noguchi, T., Tamura, K., Kaneda, T., Hashimoto, K., 2003. Effect of stress and adrenalectomy on urocortin II mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* 78, 1–11.
- van-Hover, C., Li, C., 2015. Stress-activated afferent inputs into the anterior parvocellular part of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: insights into urocortin 3 neuron activation. *Brain Res.* 1611, 29–43.

- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., Lajud, N., 2016. Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with postweaning social isolation in rats. *PLoS One* 11, e0162665.
- Venihaki, M., Sakihara, S., Subramanian, S., Dikkes, P., Weninger, S.C., Liapakis, G., Graf, T., Majzoub, J.A., 2004. Urocortin III, a brain neuropeptide of the corticotropin-releasing hormone family: modulation by stress and attenuation of some anxiety-like behaviours. *J. Neuroendocrinol.* 16, 411–422.
- Wu, Q., Zhang, L., Law, P.Y., Wei, L.N., Loh, H.H., 2009. Long-term morphine treatment decreases the association of mu-opioid receptor (MOR1) mRNA with polysomes through miRNA23b. *Mol. Pharmacol.* 75, 744–750.
- Zhang, Y., Zhu, X., Bai, M., Zhang, L., Xue, L., Yi, J., 2013. Maternal deprivation enhances behavioral vulnerability to stress associated with miR-504 expression in nucleus accumbens of rats. *PLoS One* 8, e69934.



# Corticotropin-Releasing Hormone As the Homeostatic Rheostat of Feto-Maternal Symbiosis and Developmental Programming *In Utero* and Neonatal Life

Viridiana Alcántara-Alonso<sup>1,2†</sup>, Pamela Panetta<sup>1†</sup>, Patricia de Gortari<sup>2</sup> and Dimitris K. Grammatopoulos<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Translational Medicine, Warwick Medical School, Coventry, United Kingdom, <sup>2</sup> Laboratory of Molecular Neurophysiology, Department of Neurosciences Research, National Institute of Psychiatry Ramón de la Fuente Muñiz, Mexico City, Mexico, <sup>3</sup> Clinical Biochemistry, Coventry and Warwickshire Pathology Service, UHCW NHS Trust, Coventry, United Kingdom

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Hubert Vaudry,  
University of Rouen, France

### Reviewed by:

Denis Richard,  
Laval University, Canada  
James A. Carr,  
Texas Tech University,  
United States

### \*Correspondence:

Dimitris K. Grammatopoulos  
d.grammatopoulos@  
warwick.ac.uk

<sup>†</sup>Equal first co-authors.

### Specialty section:

This article was submitted to Neuroendocrine Science, a section of the journal *Frontiers in Endocrinology*

**Received:** 02 April 2017

**Accepted:** 23 June 2017

**Published:** 11 July 2017

### Citation:

Alcántara-Alonso V, Panetta P, de Gortari P and Grammatopoulos DK (2017) Corticotropin-Releasing Hormone As the Homeostatic Rheostat of Feto-Maternal Symbiosis and Developmental Programming *In Utero* and Neonatal Life. *Front. Endocrinol.* 8:161. doi: 10.3389/fendo.2017.00161

A balanced interaction between the homeostatic mechanisms of mother and the developing organism during pregnancy and in early neonatal life is essential in order to ensure optimal fetal development, ability to respond to various external and internal challenges, protection from adverse programming, and safeguard maternal care availability after parturition. In the majority of pregnancies, this relationship is highly effective resulting in successful outcomes. However, in a number of pathological settings, perturbations of the maternal homeostasis disrupt this symbiosis and initiate adaptive responses with unpredictable outcomes for the fetus or even the neonate. This may lead to development of pathological phenotypes arising from developmental reprogramming involving interaction of genetic, epigenetic, and environmental-driven pathways, sometimes with acute consequences (e.g., growth impairment) and sometimes delayed (e.g., enhanced susceptibility to disease) that last well into adulthood. Most of these adaptive mechanisms are activated and controlled by hormones of the hypothalamo-pituitary adrenal axis under the influence of placental steroid and peptide hormones. In particular, the hypothalamic peptide corticotropin-releasing hormone (CRH) plays a key role in feto-maternal communication by orchestrating and integrating a series of neuroendocrine, immune, metabolic, and behavioral responses. CRH also regulates neural networks involved in maternal behavior and this determines efficiency of maternal care and neonate interactions. This review will summarize our current understanding of CRH actions during the perinatal period, focusing on the physiological roles for both mother and offspring and also how external challenges can alter CRH actions and potentially impact on fetus/neonate health.

**Keywords:** corticotropin-releasing hormone, placenta, hypothalamo-pituitary adrenal axis, homeostasis, glucocorticoids, allostasis, neurodevelopment, metabolism

## INTRODUCTION

The prenatal period represents an immensely challenging phase for the maternal physiology, as it requires continuous adaptive changes to accommodate functional impact of new organs such as the placenta and also increasing and variable demands in response to the new organism's growth, expansion, and development (1). These changes are also important as they prepare the mother for labor

and delivery and later maternal care. A selective redistribution of the fuels used by mother and fetus allows the pregnant mother to preferentially use fat for fuel, preserving the available glucose and amino acids for the fetus and minimizing protein catabolism. This inter-dependent sharing of metabolic resources and nutrient energy substrate availability might influence length of gestation and pregnancy outcomes. In this context, preterm onset of labor may represent a maternal adaptation to limit the metabolic cost of a pregnancy threatened by adverse conditions, or alternatively a fetal adaptation to an unfavorable intrauterine environment.

The intrauterine conditions in which the developing fetus grows have an important role in regulating the function and preserving integrity of its physiological systems later in life. Studies confirm that environmental perturbations altering the intrauterine availability of nutrients, oxygen, and hormones program fetal development and ultimately offspring physiological outcomes (2–11); thus, the ability to mount appropriate adaptive responses and counteract adversity is essential for pregnancy success and to minimize the cost on organism's health. Lessons from mammalian evolutionary biology and current developmental plasticity concepts suggest that a key player in these pregnancy-induced changes is the hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis, which regulates central and peripheral homeostatic adaptive responses to stress (12, 13). The HPA axis finely tunes the symbiotic relationship of mother and developing fetus and also determines length of gestation and timing of onset of mammalian parturition. Development of such coordinated responses is crucial since the developing fetus decodes and integrates environmental signals partly via activation of the same biological systems that in mature organisms mediate adaptation and central and peripheral biological and behavioral responses to endogenous and exogenous stressors (e.g., the maternal-placental-fetal neuroendocrine systems). Emerging data also identify the HPA axis as a key player in the development of the progeny especially the first few months outside the intrauterine environment, a critical period for development with considerable interactions between genetics and environment. However, this asymmetric interaction between two organisms in different developmental stages that requires continuous adjustment is poorly understood. This review will examine the current evidence on hormonal responses of the HPA axis initiated by the hypothalamic peptide corticotropin-releasing hormone (CRH) and the mechanisms involved in establishing an effective mother–progeny symbiosis in the prenatal environment and later during the early neonatal period, the effects of which shape the organism's health and behavior throughout life.

## MATERNAL HPA AXIS AND CRH

Pregnancy is characterized by dramatic changes in the feto-maternal stress-hormonal system that impacts on the maternal HPA axis function. The anthropoid primate placenta appears to be unique in producing CRH. There are at least two patterns of secretion of placental CRH (pCRH) across gestation among anthropoids. Certain monkeys (*Papio* and *Callithrix*) have an early-to-mid gestational peak, followed by a steady decline to a plateau level, with a possible further rise near parturition. By contrast, humans and great apes placenta secretes large

quantities of pCRH into the maternal bloodstream during the second and third trimesters of pregnancy and this exponential rise peaks at parturition (14–17). Interestingly, unlike the hypothalamic peptide, pCRH secretion is augmented by cortisol, thus providing a unique positive feedback loop extension to the feto-maternal stress axis that sustains high levels of CRH secretion throughout pregnancy (Figure 1A). Elevated maternal cortisol at 15 weeks of gestation predicts elevated CRH at 31 weeks, suggesting that elevated cortisol early in pregnancy can exert priming effects on fetal/pCRH system (18).

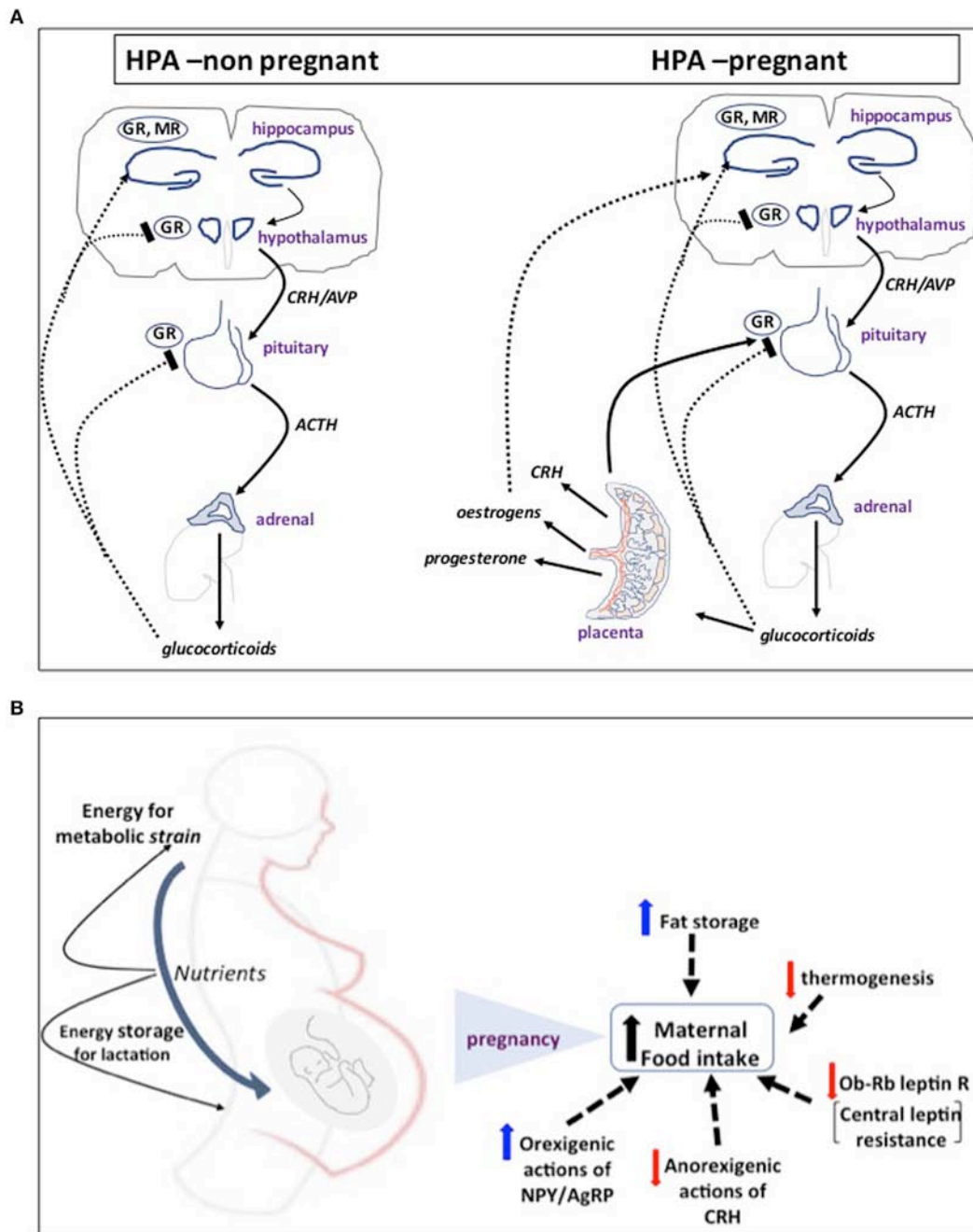
Both human and rodent feto-maternal tissues have “in-built” defense mechanisms that protect the fetus from exposure to high levels of maternal glucocorticoids and detrimental effects of programming. For example, failure of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (11 $\beta$ -HSD2) barrier to prevent fetal overexposure is associated with pregnancy complications such as lower birth weight and shorter gestation at delivery (19–21) as well as long-term consequences for the offspring, including resetting of the HPA axis and susceptibility to neurodevelopmental problems and cardio-metabolic disease (22–26).

As pregnancy progresses toward term, maternal hypothalamic production of CRH is downregulated and, thus, the responsiveness of the maternal HPA axis to both physiological and psychological stress is attenuated, a critical adaptation event that provides protection for mother and fetus from the effects of adversity (27–30). It is conceivable that women who fail to show the expected decrease in HPA reactivity to stress and anxiety are at increased risk of complications such as for preterm delivery (31–33), although assessment of anxiety during pregnancy is challenging and can be difficult to distinguish between “normal” pregnancy symptoms, which are common during pregnancy, and atypical somatic complaints such as fatigue, loss of energy, appetite, and sleep changes, which may be related to depression or anxiety.

In the postpartum period, following delivery of the placenta and a sharp drop in pCRH and steroid hormone levels, maternal plasma cortisol levels fall and the function of the mother's HPA axis and most homeostatic systems gradually return to its pre-pregnant state. Due the prolonged effects of glucocorticoids, the HPA axis is relatively hypo-responsive to dexamethasone suppression for up to 3 weeks postpartum, and recovery of CRH secretion is evident by 12 weeks postpartum (34, 35). Altered HPA responses to pregnancy may influence later maternal mental health and mood disturbances, ultimately compromising quality of maternal care in the postpartum period (36–38).

## CRH-HPA AXIS AND METABOLIC FUEL DISTRIBUTION BETWEEN MOTHER AND FETUS

To meet the increased energy demands of mother and fetus, food intake increases in pregnancy by resetting central appetite-control mechanisms (39), involving development of central leptin resistance and differential regulation of central actions of other orexigenic and anorexigenic hormones and neurosteroids that shift the balance toward increased appetite, food intake and



**FIGURE 1 | (A)** The first step of mammalian hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis activation in response to psychological or physical stressors involves activation of neurosecretory corticotropin-releasing hormone (CRH) neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. CRH and AVP released into the hypophysial portal blood system stimulate adrenocorticotropic hormone (ACTH) release from anterior pituitary corticotrophs and, in turn, the adrenal to secrete glucocorticoids (corticosterone in rodents) into the bloodstream. Cortisol tightly controls HPA activity by feeding back to glucocorticoid receptors (GR) and mineralocorticoid receptors (MR) in the pituitary and hypothalamus to turn-off CRH release and its own secretion. In humans and higher primate pregnancy, placenta secretes large quantities of CRH into the maternal bloodstream during the second and third trimesters of pregnancy. Placental CRH secretion is augmented by cortisol, thus providing a unique positive feedback loop extension to the feto-maternal stress axis that sustains high levels of CRH secretion throughout pregnancy. **(B)** In response to increased energy demands of mother and fetus, food intake increases in pregnancy by resetting central appetite-control mechanisms. A key molecular event appears to be altered leptin signaling and development of central leptin resistance. This is primarily due to decreased expression of the Ob-Rb leptin receptor in the ventromedial hypothalamus and reduced signaling activity despite increased concentration of circulating leptin as a result of expansion of the adipose tissue with contribution from placental secretion. This is coupled with differential regulation of central actions of other orexigenic and anorexigenic hormones and neurosteroids, such as CRH, NPY and AgRP, progesterone, and allopregnanolone that shift the balance toward increased appetite and food intake and fat storage and decreased thermogenesis. These mechanisms ensure that there are sufficient nutrients for the fetus, sufficient energy for the extra metabolic strain on the mother, and a surplus of energy that can be stored as fat in preparation for lactation.

fat storage, and decreased thermogenesis (39, 40) (**Figure 1B**). These mechanisms ensure that there are sufficient nutrients for the fetus, sufficient energy for the extra metabolic strain on the mother, and a surplus of stored energy. Changes in maternal metabolic state are directly transmitted to the fetus: for example, maternal hyperglycemia in pregnant women induces hyperglycemia and elevated insulin levels in the fetus, thus increasing the risk for complications in infancy and later life (41). Moreover, Barker and colleagues (42) established that derangement of fetal growth trajectories and neonatal development are directly linked to maternal nutritional status, suggesting that both intra- and extra-uterine environment work as a *continuum* to determine the metabolic status of the progeny.

Homeostatic challenges such as prenatal maternal stress can program offspring obesity and metabolic disease risk in adulthood (43–46). This involves pathogenic mechanisms reorganizing immature neural pathways at the hypothalamus (47–49). In this pathological setting, a possible indirect role for CRH in programming homeostasis of energy balance and metabolism at adulthood has been suggested since changes in growth trajectories associated with altered pCRH levels and reduced fetal growth and size at birth are predictors of childhood and adult adiposity (50). In addition, a positive association has been identified between elevated CRH at 30 weeks of gestation and a phenotypic pattern of an early small body size followed by a rapid catch-up growth (51), previously associated with early development of adiposity and insulin resistance (52). Higher circulating levels of CRH also correlate with increased central adiposity (53) and increased levels of adiponectin probably as a compensatory mechanism to improve insulin sensitivity in childhood (54).

Maternal obesity, another type of metabolic challenge, increases risk of fetus developing obesity, insulin resistance, and metabolic syndrome (49, 55–57). It is possible that during maternal obesity, CRH, up-regulated by maternal cortisol, might act as an autocrine/paracrine regulator to increase glucose uptake and facilitate transfer from the mother to the fetus through the upregulation of GLUT1 in the placenta (58). Moreover, CRH could interact with placental and peripheral systems to enhance the production of pro-inflammatory cytokines and pro-inflammatory factors that can reach the fetus. Enhanced secretion from the placenta of cytokines and adipokines are linked to a number of pathological states, including gestational diabetes, hypertension, and intrauterine growth restriction (59).

## CRH–HPA AXIS IN FETAL NEURODEVELOPMENT

Pregnancies complicated by pathological perturbations leading to poor fetal outcomes, including premature labor, hypertension, and intrauterine fetal growth retardation (IUGR) are associated with increased CRH production by the placenta and secretion into maternal blood (60–63). The diverse placental signaling mechanisms regulated by CRH suggest that elevated CRH controls the placental “surveillance and response” system so that the fetus can detect threats to survival and adjust its developmental trajectory (64–67) (**Figure 2A**). When stress signals (e.g., cortisol) from the

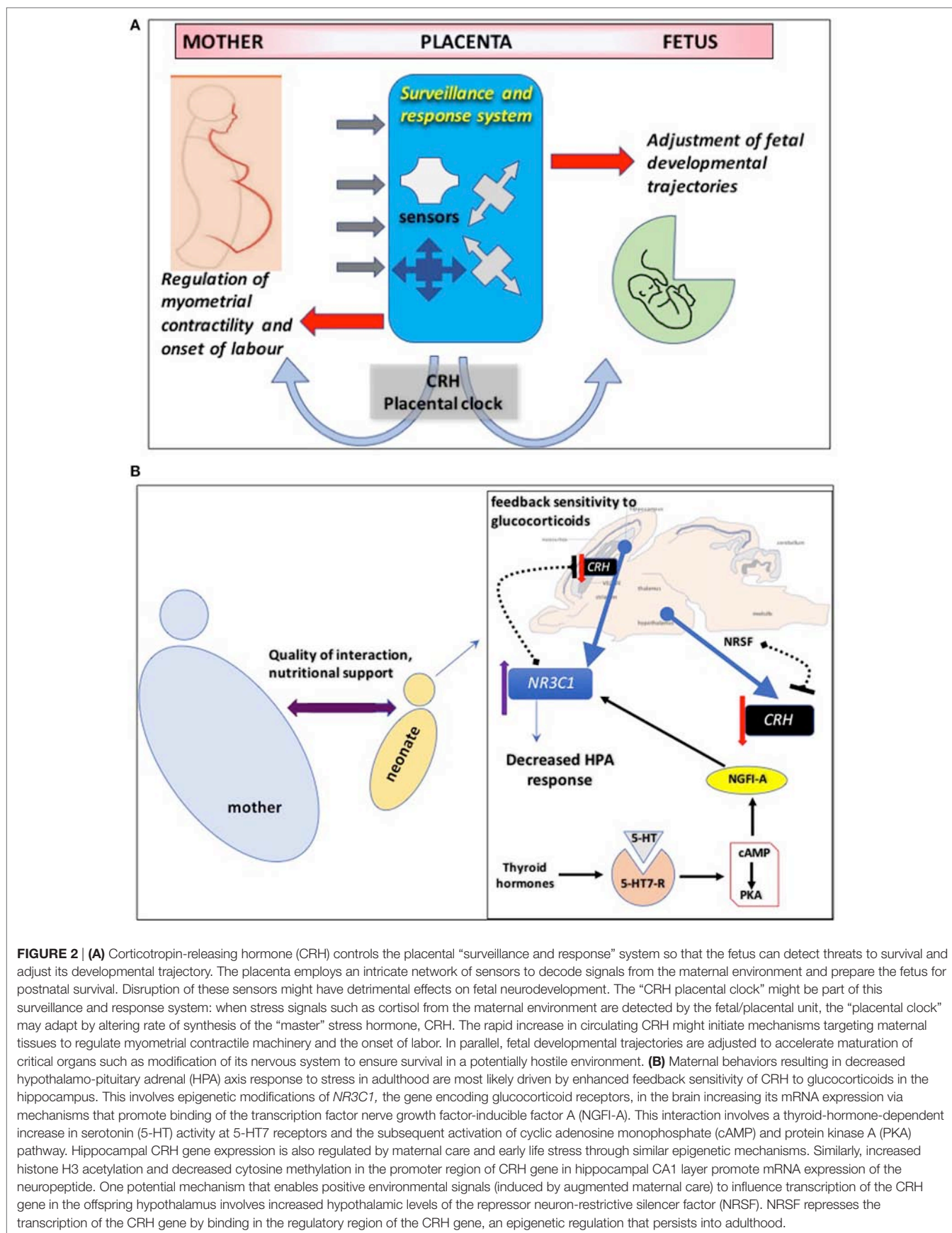
maternal environment are detected by the fetoplacental unit, the “placental clock” may adapt by altering rate of synthesis of the “master” stress hormone, CRH. The rapid increase in circulating CRH might initiate mechanisms to regulate myometrial contractile machinery and the onset of labor (68, 69). In parallel, fetal developmental trajectories are adjusted to accelerate maturation of critical organs such as modification of its nervous system to ensure survival in a potentially hostile environment (70, 71).

Evidence point toward delayed fetal maturation and impaired cognitive performance during infancy resulting in decreased brain volume in areas associated with range of cognitive functions, including learning and memory in children (72). These fetal neurobiological adjustments on brain development might involve direct effects of CRH, which can exert neurotoxic effects on hippocampal neurons especially in the immature hippocampus (73–75). In addition, elevated concentrations of CRH may affect directly the developing brain through changes in neuronal sensitivity to CRH actions especially in amygdala and hippocampus, two key regions involved in mediating the central stress response and integrating information regarding “emotional” or “cognitive” stress (76, 77).

The impairment in neurodevelopment associated with altered levels of CRH can be detected early during *in utero* life. Studies assessing neurological integrity during pregnancy suggest that exposure to lower levels of CRH early in gestation may be associated with greater maturity of the fetal central nervous system and accelerated neurological development (70). Moreover, fetal exposure to increased levels of maternal cortisol at 15 weeks and at 19 weeks of gestation and increased levels of CRH at 31 weeks gestation are associated with a significant decrease in newborn physical and neuromuscular maturation. These neonatal measures of maturation reflect altered neurological development detected with magnetic resonance imaging in newborns, including basal ganglia and white matter lesions, as well as motor abnormalities that persist in early childhood (71).

## CRH–HPA AXIS AND THE INTERACTION BETWEEN MOTHER AND THE NEONATE

After parturition, the connection between neonate and mother shifts to a new physiological equilibrium from a complete physiological dependence to one where two separate individual organisms are in close physical and behavioral contact; this biological relationship can also be influenced by environmental adversity. Young mammals still depend upon the mother for nutrition and physical stimulation as they mature toward complete nutritional independence. Any disruption of the maternal–neonate postnatal interaction by early life events can also induce programming responses with long-lasting consequences. The CRH system is recognized as key for coordinating or even directly inducing adaptations that support the organism to defend against stressful situations such as deterioration of quality of maternal care to maintain homeostasis and survival. However, the immaturity of the CRH system in the newborn makes it vulnerable and susceptible to develop functional abnormalities and ultimately disease later in life (78–80).



**FIGURE 2 | (A)** Corticotropin-releasing hormone (CRH) controls the placental “surveillance and response” system so that the fetus can detect threats to survival and adjust its developmental trajectory. The placenta employs an intricate network of sensors to decode signals from the maternal environment and prepare the fetus for postnatal survival. Disruption of these sensors might have detrimental effects on fetal neurodevelopment. The “CRH placental clock” might be part of this surveillance and response system: when stress signals such as cortisol from the maternal environment are detected by the fetal/placental unit, the “placental clock” may adapt by altering rate of synthesis of the “master” stress hormone, CRH. The rapid increase in circulating CRH might initiate mechanisms targeting maternal tissues to regulate myometrial contractile machinery and the onset of labor. In parallel, fetal developmental trajectories are adjusted to accelerate maturation of critical organs such as modification of its nervous system to ensure survival in a potentially hostile environment. **(B)** Maternal behaviors resulting in decreased hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis response to stress in adulthood are most likely driven by enhanced feedback sensitivity of CRH to glucocorticoids in the hippocampus. This involves epigenetic modifications of *NR3C1*, the gene encoding glucocorticoid receptors, in the brain increasing its mRNA expression via mechanisms that promote binding of the transcription factor nerve growth factor-inducible factor A (NGFI-A). This interaction involves a thyroid-hormone-dependent increase in serotonin (5-HT) activity at 5-HT7 receptors and the subsequent activation of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and protein kinase A (PKA) pathway. Hippocampal CRH gene expression is also regulated by maternal care and early life stress through similar epigenetic mechanisms. Similarly, increased histone H3 acetylation and decreased cytosine methylation in the promoter region of CRH gene in hippocampal CA1 layer promote mRNA expression of the neuropeptide. One potential mechanism that enables positive environmental signals (induced by augmented maternal care) to influence transcription of the CRH gene in the offspring hypothalamus involves increased hypothalamic levels of the repressor neuron-restrictive silencer factor (NRSF). NRSF represses the transcription of the CRH gene by binding in the regulatory region of the CRH gene, an epigenetic regulation that persists into adulthood.

In rodents, the period of HPA axis immaturity from birth to the second postnatal week is characterized by a stress hypo-responsive period. This has been attributed mainly to glucocorticoid receptors (GR): reduced functionality in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) would enhance expression of CRH (81, 82), although enhanced GR negative feedback in the pituitary, would diminish stress response of newborn animals (83). Similar diminished stress response is observed in humans during the first year of life (84) and in non-human primates that also respond to quality of maternal care (85).

Lactation and milk infusion can have beneficial effects on HPA axis activity and maintain low concentrations of circulating corticosterone even in the mother's absence (80). Acquisition of nutrients during lactation represents a direct bond between infant and mother in early life. Milk composition can also affect various homeostatic parameters, such as growth rate, metabolism, neurodevelopment, and stress reactivity. It is considered as the main vehicle by which glucocorticoids pass from the mother to the offspring (86, 87) and influence the expression of neonatal CRH and ultimately the normal maturation of the HPA axis (88). Thus, maternal diet plays a key role in the type of nutrients that are transferred to the neonate and HPA biological settings; consumption of a high fat diet during pregnancy and/or lactation periods increases not only the fat content of the milk but also the corticosterone plasma levels in dams. This would program the offspring not only toward overweight in the adulthood but also increases corticosterone circulating levels and the risk of metabolic syndrome (89).

## CRH AND METABOLIC ADJUSTMENTS UNDER POSTNATAL STRESS

Disruption of maternal care promotes distinct endocrine, metabolic, and behavioral phenotypic responses in the offspring. Emerging pieces of evidence suggest an early life stress-induced interaction between the HPA axis and energy balance mechanisms leading to deranged metabolic profile later in life associated with insulin resistance. An interesting hypothesis identifies liver 11 $\beta$ -HSD1–HPA axis interactions as a potential pathway in early-life stress-mediated metabolic disturbances, particularly insulin sensitivity, glucose metabolism and lipid synthesis, and mobilization possibly involving changes in glucocorticoid metabolism and signaling (90).

Maternal behaviors resulting in highly nurtured pups that exhibit decreased HPA axis response to stress in adulthood are most likely driven by enhanced feedback sensitivity to glucocorticoids in the hippocampus. This likely involves epigenetic modifications of *NR3C1*, the gene encoding GR, in the brain increasing its mRNA expression (91, 92) (**Figure 2B**). It is proposed that a global epigenetic signature of early life experience is maintained across species and centered around GR gene regulation, which targets specific regulatory regions such as gene promoters, particularly those of the protocadherin  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  gene families (93).

By contrast, a disrupted maternal care during the hypo-responsive period could also impact gene expression by opposing epigenetic mechanisms (79, 94). Postmortem studies on human

brain samples from suicide victims with reported childhood neglect/abuse support this theory and showed that methylation of the *NR3C1* promoter is increased and expression of GR reduced in hippocampal tissue (95).

Hypothalamic CRH gene expression is also regulated by maternal care and early life stress through similar epigenetic mechanisms (96). Similarly, increased histone H3 acetylation and decreased cytosine methylation in the promoter region of CRH gene in hippocampal CA1 layer promote mRNA expression of the neuropeptide induced by the same stress paradigm (97). Interestingly, environmental enrichment after weaning reverses both the epigenetic upregulation of the CRH expression and the hippocampal synaptic dysfunction of maternally separated animals (97), indicating epigenetic flexibility in this system influenced also by positive stimulus. One potential mechanism that enables positive environmental signals to influence transcription of the CRH gene in the offspring hypothalamus involves the repressor neuron-restrictive silencer factor (98).

A number of maternal deprivation experimental protocols that disrupt maternal-offspring interaction especially during the lactation period and increase the stressful environment of the pups identified altered functionality of the CRH system. These are associated with long-lasting increases in food intake, body weight, and metabolic syndrome risk. Molecular defects identified include decreased expression of CRH-R2 in the ventromedial hypothalamus (VMH) especially in the absence of sensory stimuli (99), a receptor subtype that elicits the anorexigenic effect of CRH and urocortins (100). Lack of maternal care, milk ingestion and hypothermia, lead to increased corticosterone levels (101, 102) and chronically alter the glucocorticoid feedback, maintaining increased synthesis and cerebro-spinal fluid (CSF) concentrations of CRH, as well as basal corticosterone concentrations until adulthood (103, 104). In some examples of impact of neonatal stress in adulthood, adult male offspring show increased CRH expression in the hypothalamus and hippocampus, memory deficits, dendritic atrophy, and altered adult hippocampal neurogenesis (105), whereas female adults show increased corticosterone release in response to stress, anxiety, behavior, and preference to eat palatable food compared to control rats (106). Such a hyperphagic behavior of animals experiencing maternal separation (MS) early in life could be caused by increased hypothalamic expression of NPY (107) associated with a decreased signaling of CRH-R2 receptors in the PVN. Adult MS animals show decreased behavioral and biochemical response to an intra-PVN injection of exogenous urocortin 2, suggesting its altered functionality might be attributable to a chronic stress exposure (108). The levels of CRH-R2 in the VMH are under the control of maternal stimuli in early postnatal life (99), thus, maternal care-driven mechanisms might influence CRH-R2 function in PVN. Similar to animal findings, increased basal glucocorticoid levels, altered glucocorticoid feedback and presence of higher CSF concentrations of CRH are observed in humans subjected to emotional neglect and particularly to parental stress during childhood (109–111). This hyperactivation of the HPA axis system promotes the development of obesity and metabolic syndrome (112, 113) because of the influence of glucocorticoids on orexigenic hypothalamic signals, predominantly stimulating the



drive for hypercaloric foods (112, 114, 115). Also, environmental adversity associated with low socioeconomic status during childhood is a predictor of metabolic risk factors, including increased body mass index and altered insulin sensitivity in adults with parental loss and neglect during infancy; all associated with higher basal cortisol levels (79, 115).

## CONCLUSION

Interactions of the fetus/neonate with the mother are emerging as critical for organism's development that determines resilience to adversity across the lifespan. In the developing organism, CRH and the HPA axis appear particularly sensitive to exposure to signals from the maternal environment, either physical or behavioral responses to stress or disease. Their ability to influence the activity of molecular switches and mechanisms with key roles in developmental outcomes identifies a critical need to maintain tight homeostatic control of these mechanisms since deranged adaptive responses have devastating consequences either directly or through permanent programming that influence disease susceptibility. Recognizing and characterizing these

HPA adaptations (or mal-adaptations) offer a promising strategy for development of novel preventative or therapeutic approaches.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors (VA-A, PP, PG, and DG) participated in the idea development and equally contributed in the writing up of the manuscript and approved the final version.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank colleagues within the Translational Medicine Research group at WMS for useful discussions and input in the development of the manuscript.

## FUNDING

VA-A is a Visiting scientist at the University of Warwick funded by the Mexican Council for Science and Technology (CONACyT). PP is a University of Warwick postgraduate student funded by a WCPRS/BORNE PhD scholarship.

## REFERENCES

- Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Tolppanen H, Mebazaa A. Physiological changes in pregnancy. *Cardiovasc J Afr* (2016) 27:89–94. doi:10.5830/CVJA-2016-021
- Symonds ME, Gardner DS. Experimental evidence for early nutritional programming of later health in animals. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2006) 9:278–83. doi:10.1097/01.mco.0000222112.46042.19
- Vickers MH. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. *Nutrients* (2014) 6:2165–78. doi:10.3390/nu6062165
- Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav* (2011) 104:474–9. doi:10.1016/j.physbeh.2011.05.012
- Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes* (2012) 61:2833–41. doi:10.2337/db11-0957
- Capron LE, Glover V, Pearson RM, Evans J, O'Connor TG, Stein A, et al. Associations of maternal and paternal antenatal mood with offspring anxiety disorder at age 18 years. *J Affect Disord* (2015) 187:20–6. doi:10.1016/j.jad.2015.08.012
- Cirulli F, Berry A, Alleva E. Early disruption of the mother-infant relationship: effects on brain plasticity and implications for psychopathology. *Neurosci Biobehav Rev* (2003) 27:73–82. doi:10.1016/S0149-7634(03)00010-1
- Cottrell EC, Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci* (2009) 3:19. doi:10.3389/fnbeh.2009.019.2009
- Dimasuy KG, Boeuf P, Powell TL, Jansson T. Placental responses to changes in the maternal environment determine fetal growth. *Front Physiol* (2016) 7:12. doi:10.3389/fphys.2016.00012
- Sferruzzi-Perri AN, Camm EJ. The programming power of the placenta. *Front Physiol* (2016) 7:33. doi:10.3389/fphys.2016.00033
- Cirulli F. Interactions between early life stress and metabolic stress in programming of mental and metabolic health. *Curr Opin Behav Sci* (2017) 14:65–71. doi:10.1016/j.cobeha.2016.12.009
- Bale TL, Vale WW. CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2004) 44:525–57. doi:10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121410
- Brunton PJ. Neuroactive steroids and stress axis regulation: pregnancy and beyond. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2016) 160:160–8. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.08.003
- Bowman ME, Lopata A, Jaffe RB, Golos TG, Wickings J, Smith R. Corticotropin-releasing hormone-binding protein in primates. *Am J Primatol* (2001) 53:123–30. doi:10.1002/1098-2345(200103)53:3<123::AID-AJP3>3.0.CO;2-V
- Petraglia F, Sawchenko PE, Rivier J, Vale W. Evidence for local stimulation of ACTH secretion by corticotropin-releasing factor in human placenta. *Nature* (1987) 328:717–9. doi:10.1038/328717a0
- Robinson BG, Arbiser JL, Emanuel RL, Majzoub JA. Species-specific placental corticotropin releasing hormone messenger RNA and peptide expression. *Mol Cell Endocrinol* (1989) 62:337–41. doi:10.1016/0303-7207(89)90022-1
- Smith R, Wickings EJ, Bowman ME, Belleoud A, Dubreuil G, Davies JJ, et al. Corticotropin-releasing hormone in chimpanzee and gorilla pregnancies. *J Clin Endocrinol Metab* (1999) 84:2820–5. doi:10.1210/jcem.84.8.5906
- Sandman CA, Glynn L, Schetter CD, Wadhwa P, Garite T, Chiciz-DeMet A, et al. Elevated maternal cortisol early in pregnancy predicts third trimester levels of placental corticotropin releasing hormone (CRH): priming the placental clock. *Peptides* (2006) 27:1457–63. doi:10.1016/j.peptides.2005.10.002
- Gomez-Roig MD, Mazarico E, Cardenas D, Fernandez MT, Diaz M, Ruiz de GB, et al. Placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in intrauterine growth restriction versus small-for-gestational-age fetuses. *Fetal Diagn Ther* (2016) 39:147–51. doi:10.1159/000437139
- Seckl JR, Meaney MJ. Glucocorticoid programming. *Ann N Y Acad Sci* (2004) 1032:63–84. doi:10.1196/annals.1314.006
- Demendi C, Borzsonyi B, Pajor A, Rigo J Jr, Nagy ZB, Szentpeteri I, et al. Abnormal fetomaternal glucocorticoid metabolism in the background of premature delivery: placental expression patterns of the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 2 gene. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2012) 165:210–4. doi:10.1016/j.ejogrb.2012.08.009
- Seckl JR, Holmes MC. Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* (2007) 3:479–88. doi:10.1038/ncpendmet0515
- Weinstock M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. *Brain Behav Immun* (2005) 19:296–308. doi:10.1016/j.bbi.2004.09.006
- Davis EP, Head K, Buss C, Sandman CA. Prenatal maternal cortisol concentrations predict neurodevelopment in middle childhood. *Psychoneuroendocrinology* (2017) 75:56–63. doi:10.1016/j.psyneuen.2016.10.005

25. Perrone S, Santacroce A, Picardi A, Buonocore G. Fetal programming and early identification of newborns at high risk of free radical-mediated diseases. *World J Clin Pediatr* (2016) 5:172–81. doi:10.54097/wjcp.v5.i2.172
26. Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr Physiol* (2015) 5:997–1025. doi:10.1002/cphy.c140036
27. Brunton PJ, Russell JA, Douglas AJ. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol* (2008) 20:764–76. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01735.x
28. de Weerth C, Buitelaar JK. Physiological stress reactivity in human pregnancy – a review. *Neurosci Biobehav Rev* (2005) 29:295–312. doi:10.1016/j.neubiorev.2004.10.005
29. Kammerer M, Adams D, Castelberg Bv BV, Glover V. Pregnant women become insensitive to cold stress. *BMC Pregnancy Childbirth* (2002) 2:8. doi:10.1186/1471-2393-2-8
30. Schulte HM, Weisner D, Allolio B. The corticotrophin releasing hormone test in late pregnancy: lack of adrenocorticotrophin and cortisol response. *Clin Endocrinol (Oxf)* (1990) 33:99–106. doi:10.1111/j.1365-2265.1990.tb00470.x
31. Dunkel SC, Tanner L. Anxiety, depression and stress in pregnancy: implications for mothers, children, research, and practice. *Curr Opin Psychiatry* (2012) 25:141–8. doi:10.1097/YCO.0b013e3283503680
32. Glynn LM, Schetter CD, Hobel CJ, Sandman CA. Pattern of perceived stress and anxiety in pregnancy predicts preterm birth. *Health Psychol* (2008) 27:43–51. doi:10.1037/0278-6133.27.1.43
33. Shapiro GD, Fraser WD, Frasch MG, Seguin JR. Psychosocial stress in pregnancy and preterm birth: associations and mechanisms. *J Perinat Med* (2013) 41:631–45. doi:10.1515/jpm-2012-0295
34. Magiakou MA, Mastorakos G, Rabin D, Dubbert B, Gold PW, Chrousos GP. Hypothalamic corticotropin-releasing hormone suppression during the postpartum period: implications for the increase in psychiatric manifestations at this time. *J Clin Endocrinol Metab* (1996) 81:1912–7. doi:10.1210/jcem.81.5.8626857
35. Owens PC, Smith R, Brinsmead MW, Hall C, Rowley M, Hurt D, et al. Postnatal disappearance of the pregnancy-associated reduced sensitivity of plasma cortisol to feedback inhibition. *Life Sci* (1987) 41:1745–50.
36. Bosch OJ, Musch W, Bredewold R, Slattery DA, Neumann ID. Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology* (2007) 32:267–78. doi:10.1016/j.psyneuen.2006.12.012
37. Brunton PJ. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. *Reproduction* (2013) 146:R175–89. doi:10.1530/REP-13-0258
38. Bellisario V, Panetta P, Balsevich G, Baumann V, Noble J, Raggi C, et al. Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. *Psychoneuroendocrinology* (2015) 60:138–50. doi:10.1016/j.psyneuen.2015.06.012
39. Brunton PJ, Russell JA. The expectant brain: adapting for motherhood. *Nat Rev Neurosci* (2008) 9:11–25. doi:10.1038/nrn2280
40. Ladyman SR. Leptin resistance during pregnancy in the rat. *J Neuroendocrinol* (2008) 20:269–77. doi:10.1111/j.1365-2826.2007.01628.x
41. Pedersen J. Diabetes mellitus and pregnancy: present status of the hyperglycaemia – hyperinsulinism theory and the weight of the newborn baby. *Postgrad Med J* (1971) (Suppl):66–7.
42. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* (1993) 341:938–41. doi:10.1016/0140-6736(93)91224-A
43. Entringer S. Impact of stress and stress physiology during pregnancy on child metabolic function and obesity risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* (2013) 16:320–7. doi:10.1097/MCO.0b013e32835e8d80
44. Paternain L, de la Garza AL, Batlle MA, Milagro FI, Martinez JA, Campion J. Prenatal stress increases the obesogenic effects of a high-fat-sucrose diet in adult rats in a sex-specific manner. *Stress* (2013) 16:220–32. doi:10.3109/10253890.2012.707708
45. Tamashiro KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* (2009) 58:1116–25. doi:10.2337/db08-1129
46. Marciniak A, Patro-Malyszka J, Kimber-Trojnar Z, Marciniak B, Oleszczuk J, Leszczynska-Gorzela B. Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol* (2017) 56:133–8. doi:10.1016/j.tjog.2017.01.001
47. Bouret SG. Early life origins of obesity: role of hypothalamic programming. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* (2009) 48(Suppl 1):S31–8. doi:10.1097/MPG.0b013e328181977375
48. MacKay H, Abizaid A. Embryonic development of the hypothalamic feeding circuitry: transcriptional, nutritional, and hormonal influences. *Mol Metab* (2014) 3:813–22. doi:10.1016/j.molmet.2014.09.004
49. Zambrano E, Ibanez C, Martinez-Samayo PM, Lomas-Soria C, Durand-Carbajal M, Rodriguez-Gonzalez GL. Maternal obesity: lifelong metabolic outcomes for offspring from poor developmental trajectories during the perinatal period. *Arch Med Res* (2016) 47:1–12. doi:10.1016/j.arcmed.2016.01.004
50. Kensara OA, Wootton SA, Phillips DI, Patel M, Jackson AA, Elia M. Fetal programming of body composition: relation between birth weight and body composition measured with dual-energy X-ray absorptiometry and anthropometric methods in older Englishmen. *Am J Clin Nutr* (2005) 82:980–7.
51. Stout SA, Espel EV, Sandman CA, Glynn LM, Davis EP. Fetal programming of children's obesity risk. *Psychoneuroendocrinology* (2015) 53:29–39. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.12.009
52. Ibanez L, Ong K, Dunger DB, de ZF. Early development of adiposity and insulin resistance after catch-up weight gain in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab* (2006) 91:2153–8. doi:10.1210/jc.2005-2778
53. Gillman MW, Rich-Edwards JW, Huh S, Majzoub JA, Oken E, Taveras EM, et al. Maternal corticotropin-releasing hormone levels during pregnancy and offspring adiposity. *Obesity (Silver Spring)* (2006) 14:1647–53. doi:10.1038/oby.2006.189
54. Fasting MH, Oken E, Mantzoros CS, Rich-Edwards JW, Majzoub JA, Kleinman K, et al. Maternal levels of corticotropin-releasing hormone during pregnancy in relation to adiponectin and leptin in early childhood. *J Clin Endocrinol Metab* (2009) 94:1409–15. doi:10.1210/jc.2008-1424
55. Mingrone G, Manco M, Mora ME, Guidone C, Iaconelli A, Gniuli D, et al. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. *Diabetes Care* (2008) 31:1872–6. doi:10.2337/dc08-0432
56. Whitaker RC. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics* (2004) 114:e29–36. doi:10.1542/peds.114.1.e29
57. Maffei C, Morandi A. Effect of maternal obesity on foetal growth and metabolic health of the offspring. *Obes Facts* (2017) 10:112–7. doi:10.1159/000456668
58. Gao L, Lv C, Xu C, Li Y, Cui X, Gu H, et al. Differential regulation of glucose transporters mediated by CRH receptor type 1 and type 2 in human placental trophoblasts. *Endocrinology* (2012) 153:1464–71. doi:10.1210/en.2011-1673
59. Briana DD, Malamitsi-Puchner A. Reviews: adipocytokines in normal and complicated pregnancies. *Reprod Sci* (2009) 16:921–37. doi:10.1177/1933719109336614
60. Wadhwa PD, Garite TJ, Porto M, Glynn L, Chic-DeMet A, Dunkel-Schetter C, et al. Placental corticotropin-releasing hormone (CRH), spontaneous preterm birth, and fetal growth restriction: a prospective investigation. *Am J Obstet Gynecol* (2004) 191:1063–9. doi:10.1016/j.ajog.2004.06.070
61. Whitehead CL, Walker SP, Ye L, Mendis S, Kaitu'u-Lino TJ, Lappas M, et al. Placental specific mRNA in the maternal circulation are globally dysregulated in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab* (2013) 98:E429–36. doi:10.1210/jc.2012-2468
62. Lockwood CJ, Kuczynski E. Markers of risk for preterm delivery. *J Perinat Med* (1999) 27:5–20. doi:10.1515/JPM.1999.001
63. Wolfe CD, Patel SP, Linton EA, Campbell EA, Anderson J, Dornhorst A, et al. Plasma corticotrophin-releasing factor (CRF) in abnormal pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* (1988) 95:1003–6. doi:10.1111/j.1471-0528.1988.tb06504.x
64. Clifton VL, Read MA, Leitch IM, Boura AL, Robinson PJ, Smith R. Corticotropin-releasing hormone-induced vasodilatation in the human fetal placental circulation. *J Clin Endocrinol Metab* (1994) 79:666–9. doi:10.1210/jcem.79.2.8045990
65. Harville EW, Savitz DA, Dole N, Herring AH, Thorp JM, Light KC. Stress and placental resistance measured by Doppler ultrasound in early and mid-pregnancy. *Ultrasound Obstet Gynecol* (2008) 32:23–30. doi:10.1002/uog.5344

66. Choy MY, Leung TN, Lau TK. Corticotropin-releasing hormone peptide and human first-trimester placental growth. *Early Hum Dev* (2004) 79:77–80. doi:10.1016/j.earlhumdev.2004.04.010
67. Wakahashi S, Nakabayashi K, Maruo N, Yata A, Ohara N, Maruo T. Effects of corticotropin-releasing hormone and stresscopin on vascular endothelial growth factor mRNA expression in cultured early human extravillous trophoblasts. *Endocrine* (2008) 33:144–51. doi:10.1007/s12020-008-9071-0
68. McLean M, Bisits A, Davies J, Woods R, Lowry P, Smith R. A placental clock controlling the length of human pregnancy. *Nat Med* (1995) 1:460–3. doi:10.1038/nm0595-460
69. Grammatopoulos DK. The role of CRH receptors and their agonists in myometrial contractility and quiescence during pregnancy and labour. *Front Biosci* (2007) 12:561–71. doi:10.2741/2082
70. Class QA, Buss C, Davis EP, Gierczak M, Pattillo C, Chicx-DeMet A, et al. Low levels of corticotropin-releasing hormone during early pregnancy are associated with precocious maturation of the human fetus. *Dev Neurosci* (2008) 30:419–26. doi:10.1159/000191213
71. Ellman LM, Schetter CK, Hobel CJ, Chicx-DeMet A, Glynn LM, Sandman CA. Timing of fetal exposure to stress hormones: effects on newborn physical and neuromuscular maturation. *Dev Psychobiol* (2008) 50:232–41. doi:10.1002/dev.20293
72. Sandman CA, Davis EP, Buss C, Glynn LM. Prenatal programming of human neurological function. *Int J Pept* (2011) 2011:837596. doi:10.1155/2011/837596
73. Baram TZ, Hatalski CG. Neuropeptide-mediated excitability: a key triggering mechanism for seizure generation in the developing brain. *Trends Neurosci* (1998) 21:471–6. doi:10.1016/S0166-2236(98)01275-2
74. Brunson KL, Chen Y, Avishai-Eliner S, Baram TZ. Stress and the developing hippocampus: a double-edged sword? *Mol Neurobiol* (2003) 27:121–36. doi:10.1385/MN:27:2:121
75. Hollrigel GS, Chen K, Baram TZ, Soltesz I. The pro-convulsant actions of corticotropin-releasing hormone in the hippocampus of infant rats. *Neuroscience* (1998) 84:71–9. doi:10.1016/S0306-4522(97)00499-5
76. Ehlers CL, Henriksen SJ, Wang M, Rivier J, Vale W, Bloom FE. Corticotropin releasing factor produces increases in brain excitability and convulsive seizures in rats. *Brain Res* (1983) 278:332–6. doi:10.1016/0006-8993(83)90266-4
77. Korosi A, Baram TZ. The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *Eur J Pharmacol* (2008) 583:204–14. doi:10.1016/j.ejphar.2007.11.066
78. Pihoker C, Owens MJ, Kuhn CM, Schanberg SM, Nemeroff CB. Maternal separation in neonatal rats elicits activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a putative role for corticotropin-releasing factor. *Psychoneuroendocrinology* (1993) 18:485–93. doi:10.1016/0306-4530(93)90042-J
79. Weaver IC. Shaping adult phenotypes through early life environments. *Birth Defects Res C Embryo Today* (2009) 87:314–26. doi:10.1002/bdrc.20164
80. Faturi CB, Tiba PA, Kawakami SE, Cattalani B, Kerstens M, Suchecki D. Disruptions of the mother–infant relationship and stress-related behaviours: altered corticosterone secretion does not explain everything. *Neurosci Biobehav Rev* (2010) 34:821–34. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.09.002
81. Schmidt MV. Molecular mechanisms of early life stress – lessons from mouse models. *Neurosci Biobehav Rev* (2010) 34:845–52. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.05.002
82. Walker CD, Tankosic P, Tilders FJ, Bulet A. Immunotargeted lesions of paraventricular CRF and AVP neurons in developing rats reveal the pattern of maturation of these systems and their functional importance. *J Neuroendocrinol* (1997) 9:25–41. doi:10.1046/j.1365-2826.1997.00544.x
83. van Bodegom M, Homberg JR, Henckens MJAG. Modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by early life stress exposure. *Front Cell Neurosci* (2017) 11:87. doi:10.3389/fncel.2017.00087
84. Gunnar MR, Donzella B. Social regulation of the cortisol levels in early human development. *Psychoneuroendocrinology* (2002) 27:199–220. doi:10.1016/S0306-4530(01)00045-2
85. Sanchez MM, McCormack KM, Howell BR. Social buffering of stress responses in nonhuman primates: maternal regulation of the development of emotional regulatory brain circuits. *Soc Neurosci* (2015) 10:512–26. doi:10.1080/17470919.2015.1087426
86. Brummelte S, Schmidt KL, Taves MD, Soma KK, Galea LA. Elevated corticosterone levels in stomach milk, serum, and brain of male and female offspring after maternal corticosterone treatment in the rat. *Dev Neurobiol* (2010) 70:714–25. doi:10.1002/dneu.20805
87. Benjamin Neelon SE, Stroo M, Mayhew M, Maselko J, Hoyo C. Correlation between maternal and infant cortisol varies by breastfeeding status. *Infant Behav Dev* (2015) 40:252–8. doi:10.1016/j.infbeh.2015.06.005
88. Vazquez DM, Neal CR Jr, Patel PD, Kaciroti N, Lopez JF. Regulation of corticoid and serotonin receptor brain system following early life exposure of glucocorticoids: long term implications for the neurobiology of mood. *Psychoneuroendocrinology* (2012) 37:421–37. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.07.012
89. Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol* (2014) 211:237. doi:10.1016/j.ajog.2014.03.025
90. Maniam J, Antoniadis C, Morris MJ. Early-life stress, HPA axis adaptation, and mechanisms contributing to later health outcomes. *Front Endocrinol* (2014) 5:73. doi:10.3389/fendo.2014.00073
91. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci* (2004) 7:847–54. doi:10.1038/nn1276
92. Fenoglio KA, Brunson KL, Avishai-Eliner S, Stone BA, Kapadia BJ, Baram TZ. Enduring, handling-evoked enhancement of hippocampal memory function and glucocorticoid receptor expression involves activation of the corticotropin-releasing factor type 1 receptor. *Endocrinology* (2005) 146:4090–6. doi:10.1210/en.2004-1285
93. Suderman M, McGowan PO, Sasaki A, Huang TC, Hallett MT, Meaney MJ, et al. Conserved epigenetic sensitivity to early life experience in the rat and human hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2012) 109(Suppl 2):17266–72. doi:10.1073/pnas.1121260109
94. Romens SE, McDonald J, Svaren J, Pollak SD. Associations between early life stress and gene methylation in children. *Child Dev* (2015) 86:303–9. doi:10.1111/cdev.12270
95. Labonte B, Yerko V, Gross J, Mechawar N, Meaney MJ, Szyf M, et al. Differential glucocorticoid receptor exon 1(B), 1(C), and 1(H) expression and methylation in suicide completers with a history of childhood abuse. *Biol Psychiatry* (2012) 72:41–8. doi:10.1016/j.biopsych.2012.01.034
96. Chen J, Evans AN, Liu Y, Honda M, Saavedra JM, Aguilera G. Maternal deprivation in rats is associated with corticotropin-releasing hormone (CRH) promoter hypomethylation and enhances CRH transcriptional responses to stress in adulthood. *J Neuroendocrinol* (2012) 24:1055–64. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02306.x
97. Wang A, Nie W, Li H, Hou Y, Yu Z, Fan Q, et al. Epigenetic upregulation of corticotropin-releasing hormone mediates postnatal maternal separation-induced memory deficiency. *PLoS One* (2014) 9:e94394. doi:10.1371/journal.pone.0094394
98. Singh-Taylor A, Molet J, Jiang S, Korosi A, Bolton JL, Noam Y, et al. NRSF-dependent epigenetic mechanisms contribute to programming of stress-sensitive neurons by neonatal experience, promoting resilience. *Mol Psychiatry* (2017). doi:10.1038/mp.2016.240
99. Eghbal-Ahmadi M, Avishai-Eliner S, Hatalski CG, Baram TZ. Differential regulation of the expression of corticotropin-releasing factor receptor type 2 (CRF2) in hypothalamus and amygdala of the immature rat by sensory input and food intake. *J Neurosci* (1999) 19:3982–91.
100. Pellemounter MA, Joppa M, Ling N, Foster AC. Pharmacological evidence supporting a role for central corticotropin-releasing factor(2) receptors in behavioral, but not endocrine, response to environmental stress. *J Pharmacol Exp Ther* (2002) 302:145–52. doi:10.1124/jpet.302.1.145
101. D'Amato FR, Cabib S, Puglisi-Allegra S, Patacchioli FR, Cigliana G, Maccari S, et al. Effects of acute and repeated exposure to stress on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical activity in mice during postnatal development. *Horm Behav* (1992) 26:474–85. doi:10.1016/0018-506X(92)90015-N
102. Yam KY, Naninck EF, Schmidt MV, Lucassen PJ, Korosi A. Early-life adversity programs emotional functions and the neuroendocrine stress system: the contribution of nutrition, metabolic hormones and epigenetic mechanisms. *Stress* (2015) 18:328–42. doi:10.3109/10253890.2015.1064890
103. Plotsky PM, Meaney MJ. Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* (1993) 18:195–200. doi:10.1016/0169-328X(93)90189-V

104. Arborelius L, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB. The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders. *J Endocrinol* (1999) 160:1–12. doi:10.1677/joe.0.1600001
105. Chen Y, Baram TZ. Toward understanding how early-life stress reprograms cognitive and emotional brain networks. *Neuropsychopharmacology* (2016) 41:197–206. doi:10.1038/npp.2015.181
106. Machado TD, Dalle MR, Laureano DP, Portella AK, Werlang IC, Benetti CS, et al. Early life stress is associated with anxiety, increased stress responsivity and preference for “comfort foods” in adult female rats. *Stress* (2013) 16: 549–56. doi:10.3109/10253890.2013.816841
107. Husum H, Mathe AA. Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain. Lithium treatment modifies these changes. *Neuropsychopharmacology* (2002) 27:756–64. doi:10.1016/S0893-133X(02)00363-9
108. Alcántara-Alonso V, Amaya MI, Matamoros-Trejo G, de Gortari P. Altered functionality of the corticotropin-releasing hormone receptor-2 in the hypothalamic paraventricular nucleus of hyperphagic maternally separated rats. *Neuropeptides* (2017) 63:75–82. doi:10.1016/j.npep.2017.01.006
109. Peng H, Long Y, Li J, Guo Y, Wu H, Yang Y, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis functioning and dysfunctional attitude in depressed patients with and without childhood neglect. *BMC Psychiatry* (2014) 14:45. doi:10.1186/1471-244X-14-45
110. Lee R, Geraciotti TD Jr, Kasckow JW, Coccaro EF. Childhood trauma and personality disorder: positive correlation with adult CSF corticotropin-releasing factor concentrations. *Am J Psychiatry* (2005) 162:995–7. doi:10.1176/appi.ajp.162.5.995
111. Turecki G, Meaney MJ. Effects of the social environment and stress on glucocorticoid receptor gene methylation: a systematic review. *Biol Psychiatry* (2016) 79:87–96. doi:10.1016/j.biopsych.2014.11.022
112. Dallman MF. Stress-induced obesity and the emotional nervous system. *Trends Endocrinol Metab* (2010) 21:159–65. doi:10.1016/j.tem.2009.10.004
113. Pasquali R. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex hormones in chronic stress and obesity: pathophysiological and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* (2012) 1264:20–35. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06569.x
114. Larsen PJ, Jessop DS, Chowdrey HS, Lightman SL, Mikkelsen JD. Chronic administration of glucocorticoids directly upregulates prepro-neuropeptide Y and Y1-receptor mRNA levels in the arcuate nucleus of the rat. *J Neuroendocrinol* (1994) 6:153–9. doi:10.1111/j.1365-2826.1994.tb00566.x
115. Pervanidou P, Chrousos GP. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism* (2012) 61:611–9. doi:10.1016/j.metabol.2012.01.014

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Alcántara-Alonso, Panetta, de Gortari and Grammatopoulos. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.