



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN Y PAPEL DE LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II DURANTE LA
RESPUESTA DEL EJE TIROIDEO AL AYUNO EN LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAZCANO SÁNCHEZ IVÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO

Facultad de Medicina, UNAM

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

Instituto de Neurobiología, UNAM

MÉXICO, D.F. JULIO DEL 2015.



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN Y PAPEL DE LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II DURANTE LA
RESPUESTA DEL EJE TIROIDEO AL AYUNO EN LA RATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

LAZCANO SÁNCHEZ IVÁN

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA

Instituto de Biotecnología, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO

Facultad de Medicina, UNAM

DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

Instituto de Neurobiología, UNAM

MÉXICO, D.F. JULIO DEL 2015.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO FCIE/DEP/394/15

ASUNTO: Oficio de Jurado

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de mayo de 2015**, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del (la) alumno (a) **LAZCANO SÁNCHEZ IVÁN** con número de cuenta **300218978** con la tesis titulada: "**Regulación y papel de la piroglutamil peptidasa II durante la respuesta del eje tiroideo al ayuno en la rata**", realizada bajo la dirección del (la) **DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA**:

Presidente:	DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE
Vocal:	DRA. MARTA ALICIA MENJIVAR IRAHETA
Secretario:	DRA. EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO
Suplente:	DRA. AUREA OROZCO RIVAS
Suplente	DRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 17 de junio de 2015.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



MCAA/MJFM/ASR/ipp

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

A la beca de Doctorado por parte de CONACYT,

A los miembros del Comité Tutor, la Dra. María Teresa Morales Guzmán, la Dra. Edith Sánchez Jaramillo.

Así como la ayuda técnica del QFB M. Cisneros, MVZ E. Mata, G. Cabeza(UNAM). A los apoyos CONACYT 107109 (ESJ), 154931 (JLC), DGAPA-UNAM IN206712 (JLC), IBRO/LARC PROLAB 2014 (ESJ, MP).

Al Dr. Jean Louis Charli Casalonga, a la Dra. Patricia Joseph Bravo por la oportunidad de dejarme trabajar en su laboratorio. A todo el laboratorio de Neurobiología del IBT, UNAM, por los conocimientos brindados y apoyo académico

Al personal de apoyo del laboratorio. Sra. Elena Martel, Dra. Antonieta Cote Vélez, por su apoyo en el experimento de ayuno en ratones: Dra. Rosa María Uribe Villegas, A Israim Sotelo, y Adrian Pérez por su apoyo en los experimentos de ayuno, al Q.F.B Miguel Cisneros Ramírez por su apoyo en los radioinmunoensayos y a Q. Fidelia Romero por su apoyo técnico en las técnicas de PCR.

A la M.V.Z Elizabeth Mata, a la Químico Marcela Ramírez Yarza, al laboratorista Sergio Gonzalez, a Manuel Villa por su apoyo en el Bioterio.

Este trabajo fue una colaboración entre el laboratorio del Dr. Jean Louis Charli Casalonga, IBT UNAM y el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, a cargo de la Dra. Edith Sánchez Jaramillo. La asesoría tanto en la parte experimental como en la del diseño y planteamiento de hipótesis, discusión de resultados, revisión de literatura y escritura del artículo generado con los resultados obtenidos, se llevó a cabo por los Dres. Jean Louis Charli Casalonga y la Dra. Edith Sánchez Jaramillo.

Índice

Resumen en español.....	1
Abstract.....	2
1.- Introducción.....	3
2.- Antecedentes generales.....	4
2.1.-El balance energético.....	4
2.2.- Respuestas metabólicas periféricas ante un ayuno.....	5
2.2.1.- Glucosa e insulina.....	6
2.2.2.- Ácidos grasos y cuerpos cetónicos.....	7
2.2.3.- Proteínas y aminoácidos.....	7
2.2.4.- Ghrelina y leptina.....	8
2.2.5.- Respuesta del nervio vago y el núcleo del tracto solitario.....	8
2.3.- Papel del hipotálamo en el ayuno.....	9
2.3.1.- El núcleo arcuato del hipotálamo responde a los niveles de ghrelina y leptina circulantes.....	10
2.3.2.- Papel de la eminencia media y de los tanicitos.....	12
2.4.-Generalidades sobre el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides.....	14
2.5.- Respuesta del eje adrenal al ayuno.....	18
3.- Antecedentes particulares.....	19
3.1.- El eje tiroideo durante el ayuno.....	19
3.2.- Mecanismos de control del eje tiroideo en el ayuno	20
3.2.1.- Papel de la leptina.....	21
3.2.2.- Papel de las hormonas tiroideas y desiodasas en la inhibición del eje tiroideo durante el ayuno.....	22
3.2.3.- Papel de la corticosterona.....	22
3.3.- Efecto del ayuno en ratas hembra.....	23
3.4.- Degradación de la TRH	24
3.4.1.- Degradación de la TRH por enzimas citosólicas.....	24
3.4.2.- Degradación de la TRH por la piroglutamil peptidasa II.....	25
3.4.3.- Degradación de la TRH por una enzima presente en suero.....	26

3.4.4.- Degradación de la TRH por la PPII de adenohipófisis.....	27
3.5.- Papel de la PPII de los tanicitos en el control del eje tiroideo.....	28
4.- Planteamiento del problema.....	31
5.-Hipótesis.....	32
6.- Objetivos.....	32
7.- Manuscrito requisito.....	33
8.-Discusión.....	45
9.- Conclusiones.....	53
10.- Apéndice.....	54
10.1 Efecto del ayuno y la administración exógena de leptina sobre el eje tiroideo.....	54
10.2.- Efecto del ayuno sobre el RNAm de proTRH y el RNAm de PPII.....	55
10.3.- Efecto del ayuno en ratones que carecen del gen de la PPII.....	56
10.4.- Efecto del ayuno en ratas hembra adultas.....	58
11.Bibliografía.....	60

Lista de figuras

Figura 1.- Representación esquemática de la respuesta del núcleo arcuato ante la leptina y la ghrelina.....	11
Figura 2.- Distribución espacial de las diferentes subpoblaciones de los tanicitos.....	14
Figura 3.- El eje hipotalámico-adenohipofisario-tiroideo.....	18
Figura 4.- Topografía de la PPII deducida a partir del DNAC del gen de la PPII.....	26
Figura 5.-Inmunohistoquímica dirigida a la enzima PPII en la eminencia media de la rata.....	29
Figura 6.- Mecanismo propuesto para el papel de la PPII que se expresa en los tanicitos $\beta 2$ de la eminencia media.....	30
Figura 7. Control de la TRH y de la PPII de los tanicitos durante un ayuno.....	49
Figura 8.- Respuesta del ratón nulo para la PPII en el ayuno.....	51

Resumen en español

La completa falta de alimento (ayuno) regula a la baja el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides. En esta condición, la síntesis de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) es reducida en las neuronas parvocelulares de la zona media (mPa) del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV). Estas neuronas proyectan a la eminencia media (EM) donde las terminales axónicas de TRH están en contacto íntimo con las extensiones de los tanicitos tipo $\beta 2$. Los tanicitos expresan a la piroglutamil peptidasa II (PPII), la enzima que degrada a la TRH y que se postula, controla su biodisponibilidad en la pituitaria anterior. En este trabajo probamos la hipótesis de que el ayuno regula la expresión y actividad de la enzima PPII en la EM en ratas macho adultas. Mediante la técnica de hibridación in situ semicuantitativa encontramos que los niveles del RNAm de la enzima PPII se incrementaron en los tanicitos a 48 horas después del inicio del ayuno. Este incremento fue transitorio (no detectado a las 72 horas), seguido de un incremento de la actividad de PPII en la eminencia media, y de una reversión parcial de la reducción del mRNA del pro-TRH en el NPV y del número de neuronas positivas a TRH detectadas por inmunohistoquímica. La adrenalectomía y el tratamiento con corticosterona no cambiaron la actividad de la PPII en ratas alimentadas a saciedad. El hipotiroidismo inducido por metimazol produjo una disminución profunda en el nivel del RNAm de la PPII en los tanicitos, el cual fue revertido luego de 3 días de tratamiento con T4. La actividad de la tiroliberinasasa, una isoforma de la PPII presente en el suero y secretada por el hígado, se incrementó desde las 48 hasta las 72 horas de ayuno, mientras que la actividad de la PPII de la pituitaria anterior no fue afectada. Concluimos que el incremento en la actividad de PPII en la EM así como la actividad de la tiroliberinasasa en el ayuno en la rata macho, puede facilitar la reducción profunda del eje tiroideo, a pesar de la reactivación parcial de la síntesis de TRH en el NPV.

Abstract

Fasting down-regulates the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis. Thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesis is reduced in neurons of the parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). These neurons project to the median eminence (ME) where TRH terminals are close to the cytoplasmic extensions of $\beta 2$ tanycytes. Tanycytes express pyroglutamyl peptidase II (PPII), the TRH-degrading ectoenzyme that controls the amount of TRH that reaches the anterior pituitary. We tested the hypothesis that fasting regulates ME PPII expression and activity in male rats. Semi-quantitative in situ hybridization data indicated that PPII mRNA levels increased in tanycytes 48 h after fasting initiation. This increase was transitory (not detected at 72 h), and followed by an increase of PPII activity in the ME, and a partial reversion of the reduction in NPV pro-TRH mRNA levels and number of TRH neurons detected by immunohistochemistry. Adrenalectomy and corticosterone treatment did not change ME PPII activity 72 h hour later. Methimazole-induced hypothyroidism produced a profound drop in tanycytes PPII mRNA levels, which was reverted by 3 days of treatment with T4. The activity of thyroliberinase, the serum isoform of PPII secreted by the liver, was increased at most fasting time points studied, whereas anterior pituitary PPII activity was not affected. We conclude that in fasting male rats delayed increases in ME PPII as well as in thyroliberinase activities may facilitate the maintenance of the deep reduction of HPT axis function, in spite of a partial reactivation of TRH expression in the PVN.

1.- Introducción

En la actualidad muchas naciones subdesarrolladas padecen hambre. El consumo de alimentos es fundamental para obtener energía para realizar las funciones que ocurren dentro de nuestro organismo, como la respiración, el mantenimiento de la temperatura corporal, la actividad física. El concepto de hambre, definido como la necesidad del organismo de consumir alimentos es en realidad un proceso muy complejo que involucra diversas respuestas de nuestro organismo para generar esa sensación y finalmente culminar con el consumo de alimentos. A diferencia de los estudios sobre la obesidad (balance energético positivo) y sus efectos sobre el organismo, la respuesta ante la falta de alimento como la restricción alimentario, el ayuno o la anorexia nerviosa (balance energético negativo) ha sido estudiada en menor grado. No obstante se sabe que el balance energético negativo conduce a un ajuste en la actividad de los ejes neuroendócrinos, que controlan la reproducción, el crecimiento y el metabolismo (Sainsbury et al., 2011). Cuando las reservas de alimento son bajas, el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides es regulado negativamente a través de múltiples cambios que se llevan a cabo en tejidos específicos (Sainsbury et al., 2012), estos eventos contribuyen a reducir las hormonas tiroideas en la circulación y el gasto energético. En el núcleo paraventricular del hipotálamo, un balance energético negativo decrementa la expresión del precursor de la hormona liberadora de tirotropina (pro-TRH) así como la concentración de la TRH en la eminencia media (Blake et al., 1991). La regulación negativa de la síntesis y liberación de TRH durante el ayuno probablemente contribuyen a la disminución de la actividad del eje tiroideo, pero la hidrólisis de la TRH en el espacio extracelular pudiese ser otro mecanismo de control adicional. La TRH es hidrolizada *in vitro* por la piroglutamil peptidasa II) (EC 3.4.19.6) una ectoenzima con amplia especificidad (Charli et al., 1998) y que se expresada en unas células gliales especializadas localizadas en la eminencia media llamadas tanicitos, donde regula la concentración de TRH en el espacio extracelular, antes de que la TRH alcance sus células blanco en la pituitaria anterior (Sánchez et al., 2009). Hasta el momento no hay estudios que muestren el papel de una ectoenzima en la regulación negativa del eje tiroideo. Los mecanismos que regulan el eje tiroideo durante el ayuno no están completamente dilucidados, por lo que ampliar el conocimiento básico sobre la regulación de este eje puede ayudarnos a mejorar la comprensión de los eventos que conducen a la inhibición de

este eje. En esta tesis se investigó la hipótesis de que la expresión y actividad de la PPII en la eminencia media se ajusta durante el ayuno como un mecanismo adicional para la regulación negativa del eje tiroideo. Puesto que la PPII se expresa en otros compartimentos, analizamos la respuesta de la PPII en la pituitaria anterior, el suero (una isoforma soluble), y la corteza parietal, para dilucidar si los cambios producidos por el ayuno son tejido específico. Además identificamos mecanismos regulatorios de la PPII de la eminencia media administrando leptina exógena, corticosterona exógena y manipulando a las hormonas tiroideas. Por otra parte se analizó el efecto del ayuno en un ratón que carece del gen funcional de la PPII para ver la respuesta del eje tiroideo durante el ayuno en ausencia de PPII. Finalmente en este estudio se analizó si el efecto del ayuno sobre la actividad de la PPII depende del género, mediante un experimento preliminar de ayuno en ratas hembra adultas.

2.- Antecedentes generales

2.1.- El balance energético

El consumo de alimento es fundamental para la sobrevivencia de los organismos. El catabolismo de las biomoléculas provenientes de los alimentos (carbohidratos, proteínas, grasas) es la fuente próxima de la energía que los animales utilizan para funciones tan diversas como la contracción muscular, incluyendo la actividad cardiaca, la actividad eléctrica, la generación del calor corporal y la actividad física entre otras funciones que permiten la supervivencia del organismo (Havel 2011). Cuando un organismo se alimenta ocurren varias respuestas hormonales y centrales para detener el consumo de alimentos una vez que está satisfecho (regulación a corto plazo). Al mismo tiempo, se promueve la estabilidad de las reservas de energía para mantener un peso corporal constante (regulación a largo plazo), estos eventos conllevan un equilibrio entre la entrada y consumo de energía denominado, balance energético (Remers et al., 2011). Sin embargo, cuando un organismo tiene algún déficit energético (como en el ayuno, la restricción alimentaria o la anorexia nerviosa) se aumenta la utilización de reservas (liberación de glucagón al suero con incremento de la gluconeogénesis y utilización de ácidos grasos libres) pero también se aumenta la expresión de péptidos que provocan el apetito (péptidos orexigénicos) y al mismo tiempo se inhibe la síntesis y liberación de los que inhiben el apetito (péptidos

anorexigénicos) a nivel periférico y central lo que promueva la búsqueda y el consumo de alimentos (Remers et al., 2011).

Ya que se requiere de una adecuada alimentación para mantener las funciones vitales de los organismos, se pudiera pensar que ante un déficit energético se provocan alteraciones sin control en todo el organismo. Sin embargo, durante la evolución se han creado respuestas fisiológicas específicas ante déficits energéticos para permitir la sobrevivencia del organismo y proteger a la especie a través del tiempo. Por ejemplo, la actividad del eje de la reproducción se afecta negativamente, lo que reduce las probabilidades de reproducirse y cuidar un feto en condiciones de desnutrición (Sainsbury et al., 2011). Otro eje afectado ante un déficit energético es el eje tiroideo. En humanos y modelos animales, la actividad de este eje se reduce durante la restricción alimentaria y durante el ayuno. Ya que la activación del eje tiroideo promueve el consumo de energía mediante la termogénesis facultativa y adaptativa y el gasto energético (Silva, 2006), se ha propuesto que durante un ayuno este eje disminuye su actividad durante un ayuno como una manera de economizar energía ante déficits energéticos. La regulación de este eje ante el ayuno está bien documentada, con varias respuestas órgano y proteína específicas que permiten la reducción de la actividad del eje (Sainsbury et al., 2011). Antes de describir a fondo el efecto del ayuno sobre la actividad del eje tiroideo, primero se describirán las respuestas hormonales periféricas y centrales ante el ayuno, como un modelo de déficit energético ampliamente estudiado en los roedores.

2.2.- Respuestas metabólicas periféricas ante un ayuno

La restricción alimentaria en roedores es un protocolo que se utiliza para determinar el efecto de la disminución de disponibilidad de alimento que consume un animal rutinariamente, teniendo consecuencias como la pérdida de peso. Esto implica un balance energético negativo y aunque este modelo experimental genera resultados que van en la misma dirección que la ausencia completa de alimentos como en el ayuno, los animales siguen teniendo cierta entrada de energía. Este trabajo está basado en la deprivación completa de alimento (ayuno); se describen respuestas tanto periféricas como centrales en roedores con ayuno y su relación con la actividad del eje tiroideo bajo esta condición, con

un enfoque particular en la molécula bioactiva de TRH y la regulación de su degradación en la terminal nerviosa.

Ante un ayuno, el organismo coordina varias respuestas para minimizar el impacto del déficit energético, y adecuar su comportamiento. Las respuestas de un organismo ante la falta de alimento se llevan a cabo en diferentes etapas en las que participan múltiples órganos y diferentes metabolitos para permitir la sobrevivencia del organismo. En primer lugar, el tracto digestivo detecta la ausencia de nutrientes (por la disminución de la distensión de este órgano) mientras que el hígado aumenta la glucogenólisis, comienza a liberar cuerpos cetónicos y el tejido adiposo aumenta la secreción de ácidos grasos los cuales pueden transformarse en glucosa en el hígado, todo esto para compensar la caída de glucosa en la circulación (Friesman y Sticker., 1976). Si las reservas de glucógeno en el hígado caen y las reservas energéticas del tejido adiposo ya no son suficientes por causa de un ayuno prolongado, el organismo usa como última fuente de energía oxidable las proteínas del organismo, esto es ejemplificado en ratas obesas cuya utilización de proteínas es mucho más tardía que en ratas no obesas, este retraso se debe a la mayor cantidad de tejido adiposo que tienen las primeras (Cherel et al., 1991). En conclusión, la utilización de biomoléculas como fuente de energía durante el ayuno sigue este orden; glucosa, ácidos grasos y cuerpos cetónicos, y las proteínas. A continuación se enlista la respuesta de diferentes algunos de los marcadores metabólicos más estudiados ante un déficit energético en los mamíferos.

2.2.1.- Glucosa e insulina

La glucosa es la principal fuente de energía de los vertebrados. En los mamíferos la regulación de la concentración de la glucosa en sangre está regulada por dos hormonas pancreáticas, la insulina y el glucagon. Cuando un organismo se alimenta, un incremento en la secreción de insulina permite la permeabilidad de la glucosa en las células del organismo para que éstas puedan utilizarla como energía, por el contrario, cuando el organismo se encuentra en ayuno, la insulina disminuye su secreción y se secreta glucagon, que se encarga de promover la degradación de glicógeno en el hígado para obtener glucosa. En la rata, 24 horas de ayuno disminuye la concentración de glucosa en sangre hacia valores que

se mantienen relativamente bajos y constantes durante 7 días de ayuno (Chatamra et al., 1984; Walder et al., 1998). Adicionalmente, el déficit energético perjudica la sensibilidad de las células del páncreas para liberar insulina en respuesta a glucosa, 24 horas después de ayunar a una rata (Zawalich y Zawalich., 2000). En ratas, la insulina sérica disminuye tras 24 horas de ayuno (Walder et al., 1998). Por lo tanto, la concentración sérica de glucosa y la secreción de insulina dependiente de glucosa se ven afectadas negativamente ante un ayuno.

2.2.2.- Ácidos grasos y cuerpos cetónicos

En estadios de déficit energético, después de la disminución de glucosa en la sangre y la terminación de las reservas de glicógeno, los triglicéridos del tejido adiposo son hidrolizados por una enzima llamada lipasa sensible a hormona para ácidos grasos libres los cuales proporcionarán energía oxidable a órganos como el corazón, musculo esquelético e hígado. Esto se debe a un incremento en el RNAm y la actividad de la hormona sensible a lipasa debido a una disminución de la concentración de insulina en el suero, esto promueve que la vida media del AMPc aumente en los adipocitos y fosforile a dicha enzima aumentando su expresión y actividad (Sztalryd and Kraemer, 1994., Dominique et al., 1996). En ratones, 2 a 18 horas de ayuno provocan un incremento en los ácidos grasos libres en el plasma (Steyn et al., 2012), mientras que en la rata 16 horas de ayuno aumentan diferentes tipos de ácidos grasos en la circulación (Yu et al., 2006). Finalmente, los cuerpos cetónicos (acetona, acetato y el ácido β -hidroxibutirato) son moléculas insolubles en agua que son producidas por el hígado a partir de ácidos grasos libres provenientes de los adipocitos en respuesta al ayuno. Los cuerpos cetónicos son transformados posteriormente a acetil-CoA en el interior de las células y esta molécula posteriormente brindará energía a las mitocondrias de las células como el corazón y el cerebro. En ratas de 3, 8 y 32 semanas de edad, se alcanza un pico de cuerpos cetónicos en la circulación posterior a las 48 horas de ayuno (Higashino-Matzui et al., 2012).

2.2.3.- Proteínas y aminoácidos

Cuando un ayuno es prolongado y las reservas de ácidos grasos están por culminar, la última fuente de energía utilizada son las proteínas del organismo, la proteína que se utiliza para este proceso proviene principalmente del músculo (Addis et al. 1936) en donde las

proteínas son degradadas a sus subunidades más pequeñas, los aminoácidos y entran al ciclo de los ácidos tricarbónicos para generar glucosa. En esta fase del ayuno ocurre además un aumento en la actividad locomotora (propuesta como una respuesta conductual asociada a la búsqueda de alimento) y se incrementa la excreción de urea, reflejando el catabolismo de las proteínas (Koubi et al., 2001, Cherel et al., 2002). Los mecanismos moleculares que promueven esta movilización no están dilucidados.

2.2.4.- Ghrelina y leptina

Las hormonas ghrelina y leptina son hormonas liberadas del estómago y del tejido adiposo blanco, respectivamente. La hormona ghrelina es conocida como la hormona del hambre. así, en respuesta al déficit energético, la concentración de ghrelina en la sangre aumenta y muestra una tendencia a regresar a niveles basales a las 48 horas en la rata (Toshinai et al., 2001). En el ratón ocurre la misma respuesta y la ghrelina circulante aumenta de las 9 a las 18 horas de ayuno (Steyn et al., 2012). En humanos se ha postulado a la hormona motilina como la responsable de inducir el aumento de ghrelina en el estómago (Sanger y Lee., 2008). En cuanto a la leptina, la respuesta es inversa y muestra decrementos en la circulación en animales sometidos a ayuno, por ejemplo, se ha monitoreado la caída de la leptina circulante desde las 16 horas y el efecto se mantiene hasta 72 horas de ayuno en las ratas (Walder et al. 1998). En el ratón, se disminuyen progresivamente la concentración de la leptina circulante desde las 2 horas y se mantienen bajas durante todo el periodo de ayuno (Steyn et al., 2012).

2.2.5.- Respuesta del nervio vago y el núcleo del tracto solitario.

Ante un ayuno, diferentes respuestas centrales se activan y promueven la búsqueda de alimento. Para ello, el estómago y diferentes centros del cerebro interactúan para inducir el apetito y conductas relacionadas con la búsqueda de alimento. Diferentes hormonas que son liberadas durante el ayuno pueden informar al cerebro del ayuno (respuesta endócrina) vía directa pero también a través del nervio vago. Este se define como un conjunto de nervios que contactan diferentes vísceras como el tracto gastrointestinal, el páncreas y el hígado a una región del cerebro llamada núcleo del tracto solitario (NTS). En lo que respecta al nervio vago y la regulación del balance energético, las conexiones que se encuentran sobre

el tracto gastrointestinal detectan los cambios mecánicos y hormonales en el ayuno y también transmite información de osmoreceptores localizados en el duodeno y de los glucoreceptores del hígado (respuesta autónoma) (Grill y Hayes 2009). Se postula que la activación del nervio vago es integrada en el NTS y más tarde esta señal es transmitida al hipotálamo para generar las respuestas adecuadas a la estimulación producida por la falta de alimentos. El NTS no solo participa en el relevo de la información del nervio vago, también expresa receptores a leptina y la delección del receptor a leptina en esta zona produce hiperfagia (Hayes et al., 2010), indicando el papel de la leptina en el consumo de alimentos. Otros efectos relacionados con el consumo de alimentos en el NTS son llevados a cabo por el péptido similar al glucagon-1 (GLP-1) que se libera ante los cambios nutricionales y mecánicos del tracto gastrointestinal y este actúa sobre su receptor GLP-1R localizado en el NTS y potenciando el efecto de la leptina (Grill y Hayes 2009). En esta zona, la administración del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) disminuye el consumo de alimento y también potencia el efecto anorexigénico de la leptina (Sphaet et al., 2012). Recientes estudios han mostrado que la ghrelina regula aspectos del balance energético en esta zona, independientemente de los efectos de esta hormona en el hipotálamo. La administración de un anticuerpo contra ghrelina, con la intención de abatir su función orexigénica, disminuye el consumo de alimento (Solomon et al., 2006). Por tanto, el NTS es una región que contiene elementos para integrar los cambios periféricos y nerviosos asociados al ayuno.

2.3.- Papel del hipotálamo en el ayuno

Los organismos multicelulares utilizan señales para comunicar diferentes compartimentos, a veces ubicados a distancias relativamente grandes y así coordinar funciones que dependen de la participación de diferentes órganos. Los ejes neuroendócrinos son ejemplo de la comunicación intercelular a distancia en los organismos multicelulares. Órganos, células, enzimas, receptores, mensajeros químicos y cascadas intracelulares particulares, regulan la función de los diferentes ejes. Ante un déficit energético, el eje tiroideo, el eje del crecimiento, y el eje de la reproducción se inhiben, mientras que el eje del estrés, el eje adrenal, se activa (Sainsbury et al., 2011). Se ha comprobado que estos ejes se regulan ante un déficit energético de acuerdo a los cambios de las hormonas circulantes leptina y

ghrelina. Los niveles de leptina y ghrelina son detectados por neuronas del hipotálamo (denominadas de primer orden), en particular por las neuronas del núcleo arcuato que tienen receptores para estas hormonas. Las neuronas de primer orden se denominan sistema de melanocortinas; contienen diferentes subpoblaciones celulares que a su vez envían señales mediante la liberación de sus péptidos contenidos en las terminaciones nerviosas a diferentes núcleos del cerebro (neuronas de segundo orden), en particular a neuronas del mismo hipotálamo que participan en la regulación del balance energético como el NPV (Núcleo paraventricular), el NDM (núcleo dosomedial) y el hipotálamo lateral (HL) (Bouret et al., 2004., Sainsbury et al., 2011). A continuación se describe el mecanismo por el cual funciona el sistema de melanocortinas del núcleo arcuato.

2.3.1.- El núcleo arcuato del hipotálamo responde a los niveles de ghrelina y leptina circulantes.

En el núcleo arcuato, el sistema de melanocortinas se compone de diferentes subpoblaciones neuronales que son blanco de leptina y ghrelina, y por lo tanto, son neuronas que llevan el mensaje del estatus energético periférico de un organismo al cerebro (figura 1). El sistema de melanocortinas se denomina así porque uno de los péptidos (la hormona estimuladora de los α -melanocitos), y sus receptores (receptor de melanocortinas 3 y 4, Mc3R y Mc4R) participan en la regulación de este sistema. Además contiene subpoblaciones neuronales que sintetizan y liberan a dos péptidos denominados “neuropéptido Y (NPY)” y “proteína relacionada con el agouti” (neuronas NPY/AgRP), cuyas similitudes fisiológicas son que ambas son reguladas positivamente por ghrelina y negativamente por leptina (Barsh y Schwartz, 2002), además estos péptidos son sintetizados por las mismas neuronas del núcleo arcuato (Hahn et al., 1998). Consistente con este papel, la inyección intraperitoneal de ghrelina y la administración central de NPY promueven un aumento en el consumo de alimento y ganancia del peso corporal en animales control (Gehlert 1999, Cabral et al., 2013). Por lo tanto, la estimulación de estas neuronas provoca el apetito y el consumo de alimentos (Sainsbury et al., 2011). Por otro lado, otra subpoblación de neuronas del arcuato, coexpresan al péptido denominado transcrito regulado por cocaína y anfetamina (CART) y a la proopiomelanocortina (POMC) (neuronas POMC/CART); dichas neuronas coexisten en las mismas neuronas (Elias et al.,

1998) y proyectan también hacia otras neuronas (neuronas de segundo orden) incluyendo núcleos hipotálamicos liberando CART y la hormona estimuladora de los α -melanocitos (α -MSH), un producto del procesamiento del gen POMC. Como resultado, la estimulación de estas neuronas por la leptina, provoca la disminución del apetito, la disminución del consumo de alimentos y se promueve el gasto energético y (Barsh y Schwartz, 2002).

En el déficit energético, cuando la concentración de ghrelina aumenta y la de leptina disminuye, la ghrelina llega al cerebro atravesando la eminencia media (cuya descripción se detalla más adelante) y activando la subpoblación de neuronas NPY/AgRP. La caída en la concentración de leptina provoca una inhibición de la síntesis y liberación de POMC/CART y por tanto de la liberación de α -MSH dando como resultado final, la búsqueda y el consumo de alimento ante el ayuno para mantener la homeostasis del organismo (figura 1).

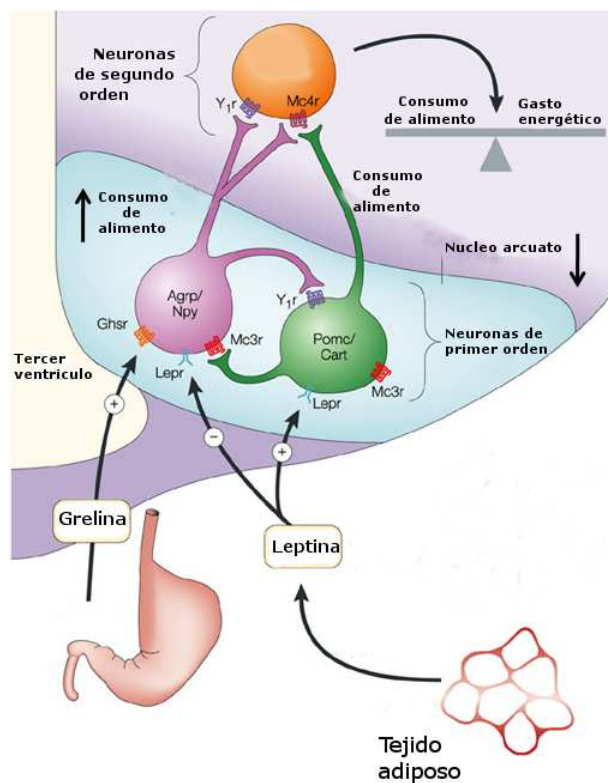


Figura 1.- Representación esquemática de la respuesta del núcleo arcuato ante la leptina y la ghrelina. En el núcleo arcuato existen dos subpoblaciones neuronales (AgRP/NPY y POMC/CART) que detectan los niveles de ghrelina y leptina provenientes de la periferia. Estas neuronas envían señales a otros blancos para coordinar respuestas centrales, a cambios en el estado energético del organismo (Tomado y modificado de Barsh y Schwartz, 2002).

1.3.2.- Papel de la eminencia media y de los tanicitos

La comunicación y el control de los ejes hipotálamo-pituitaria-órganos periféricos se lleva a cabo gracias a una microestructura localizada en la base del cerebro denominada eminencia media, cuya estructura es definida como una región está compuesta por células neurosecretoras, recibe flujo sanguíneo a través de un sistema de vasos sanguíneos denominado sistema portahipofisiario, contiene células ependimales y gliales que permiten el transporte de mensajeros químicos que van del cerebro a la periferia y viceversa. Por ejemplo, los tanicitos, un tipo de células gliales especializadas que se describirán en el siguiente párrafo, son los responsables de transportar leptina y ghrelina de la circulación al sistema nervioso central (Cabral et al., 2012., Balland et al., 2014) Por lo tanto, la eminencia media es una de las rutas de acceso al cerebro de las moléculas periféricas que se liberan durante el ayuno. Esta estructura está conservada en todos los vertebrados y aquellos organismos que no pertenecen al sub filum de vertebrados no contienen este sistema portahipofisiario y por lo tanto, la comunicación entre ambos órganos se realiza de manera directa entre los axones del hipotálamo y las células de la pituitaria anterior (Kobayashi et al., 1970).

Existen cuatro subtipos celulares de tanicitos clasificados de acuerdo a su anatomía, distribución y las moléculas que se expresan en cada subpoblación (α_1 , α_2 , β_1 y β_2 , figura 4) (Rodríguez et al., 2005). Los somas de estas cuatro subpoblaciones se encuentran distribuidos en dos tercios del tercer ventrículo, en contacto con el fluido cerebroespinal; tienen la particularidad de tener extensiones citoplasmáticas que contactan algunas zonas del hipotálamo, por ejemplo, las extensiones de la subpoblación α_1 contacta al núcleo dorsomedial (NDM), las extensiones de la subpoblación α_2 contactan al núcleo ventromedial (NVM), las extensiones de la subpoblación β_1 contactan a las neuronas del núcleo arcuato y las extensiones de la subpoblación β_2 contactan a los capilares del sistema portahipofisiario de la eminencia media (Rodríguez et al., 2005). Esta última subpoblación tiene la particularidad de funcionar como una barrera de comunicación entre el sistema nervioso central y periférico. Hormonas como la leptina y la ghrelina han mostrado ser internalizadas por los tanicitos β_2 : recientemente se ha demostrado que la leptina y la ghrelina periférica son capturadas por las extensiones citoplasmáticas de los tanicitos de la

eminencia media y transportados al fluido cerebroespinal donde posteriormente difunden y llega a regiones del hipotálamo mediobasal como el núcleo arcuato, NDM y el NVM (Schaffer et al., 2014.,Balland et al., 2014).

La diferenciación de los tanicitos en la rata comienza en el día embrionario 19 y su maduración continua hasta 30 días después del nacimiento (Rodríguez et al., 2005). Recientemente se han identificado algunos factores que contribuyen a la diferenciación específica de los tanicitos en el desarrollo del ratón; se ha identificado por ejemplo a un factor transcripcional denominado LHX2 cuya pérdida de función evita que los tanicitos logren establecer su fenotipo durante el desarrollo, debido en parte a que LHX2 regula positivamente a Rax (Retinal homeobox protein), un factor de transcripción necesario para el desarrollo de los tanicitos (Salvatierra et al., 2015). La pérdida de función de LHX2 en el ratón adulto tiene además efectos fisiológicos importantes; por ejemplo, los tanicitos dejan de expresar a la enzima desiodasa 2 y a Rax (Salvatierra et al., 2015), indicando que este factor es necesario no solo en el desarrollo, si no que en la etapa adulta mantiene la identidad molecular de estas células. Al igual que en el desarrollo, las células gliales radiales pueden generar nuevas neuronas en algunas zonas particulares del cerebro en el cerebro adulto y los tanicitos hipotalámicos han mostrado ser progenitores de células neuronales. Una proteína poco caracterizada en vertebrados denominada UGS148 y que se expresa específicamente en células pluripotentes se expresa en los tanicitos (Ming-San Ma et al., 2014). Estas células han mostrado generar nuevas neuronas ante diferentes estímulos fisiológicos, por ejemplo, dietas altas en grasa (Lee et al., 2012) y el ejercicio voluntario (Niwa et al., 2015).

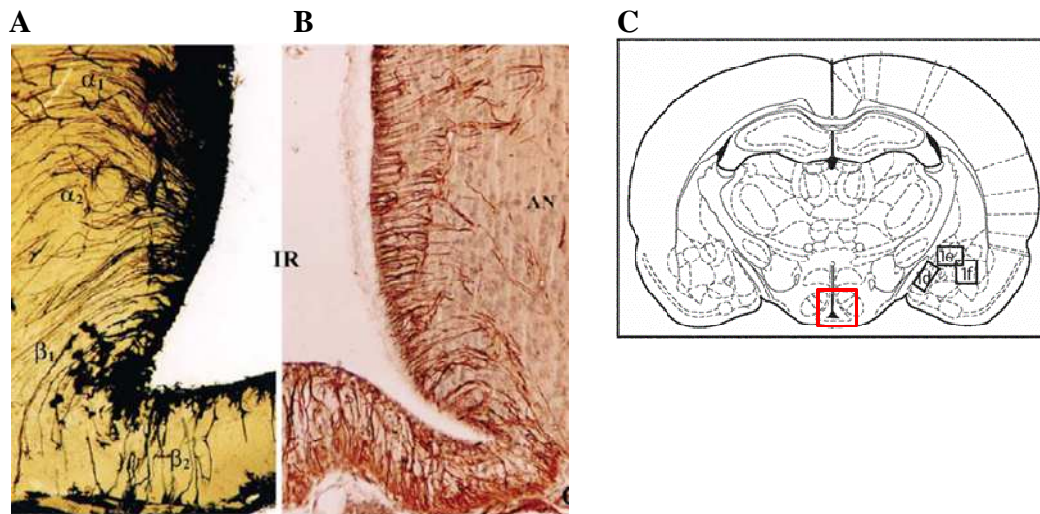


Figura 2. Distribución espacial de las diferentes subpoblaciones de los tanocitos. A.- Se muestra mediante una tinción de Golgi (negro) la presencia de los subtipos de tanocitos alrededor del tercer ventrículo y sus extensiones citoplasmáticas dirigiéndose hacia diferentes zonas del hipotálamo. B.- Se muestra una tinción con vimentina, un marcador de los tanocitos (Imagen tomada de Rodríguez et al., 2005). C.- Se muestra mediante un cuadro rojo la ubicación de la figura izquierda en un corte coronal del cerebro de la rata.

1.4.- Generalidades sobre el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides

A nivel de cerebro, específicamente en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) se sintetiza la hormona liberadora de tirotrópina (TRH: pGlu-His-Pro-NH₂). En el NPV existen distintos tipos de neuronas que expresan a la TRH, pero solo las que se encuentran en la zona parvocelular media proyectan sus axones hacia la eminencia media (Fekete et al., 2000., Kádár et al., 2011) y por tanto, controlan el eje tiroideo. El gen de la TRH se conforma de 3 exones y 2 intrones, que luego de un proceso de edición o “splicing” alternativo genera un precursor de alto peso molecular que contiene 5 veces repetida la secuencia Gln-His-Pro-Gly. Mediante el empleo de cultivos primarios hipotalámicos de rata, se ha observado que el procesamiento del precursor de TRH tiene lugar durante el transporte axonal para posteriormente almacenarse en las terminaciones nerviosas (Nillni et al., 1996). Durante su recorrido a través del sistema de endomembranas (retículo endoplásmico, aparato de Golgi y vesículas de transporte) este precursor es hidrolizado por las convertasas de prohormonas (PC’s, por sus siglas en inglés, “protein convertases”) y la carboxipeptidasa E, para generar Gln-His-Pro-Gly; enseguida, la enzima glutaminil ciclasa convierte la Gln a pGlu y finalmente una monooxigenasa alfa-amidante de la peptidoglicina

(PAM) forma el extremo NH₂ a partir de la glicina, generando el péptido maduro (Joseph-Bravo et al., 1998). Así, bajo un estímulo fisiológico, la TRH madura será liberada de las terminales axónicas del NPV en la eminencia media para posteriormente ser transportada a la adenohipófisis o pituitaria anterior, en donde ejercerá su acción.

En la adenohipofisis, la TRH aumenta la síntesis y liberación de tirotropina (TSH) mediante su unión a un receptor denominado TRH-R1, el cual es un receptor de la familia de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G (Straub et al., 1990). Aunque el efecto más conocido de la TSH es la inducción de la síntesis y liberación de hormonas tiroideas en la glándula tiroides, recientemente se ha demostrado que la TSH tiene efectos independientes de la glándula tiroides. La TSH ha mostrado modular el balance energético mediante su acción en otros tejidos distintos de la tiroides, donde también se expresa su receptor (TSH-R), por ejemplo, la TSH aumenta la lipólisis en el tejido adiposo blanco *in vitro* y aumenta la concentración circulante de ácidos grasos libres (Gagnon et al., 2010), mientras que en el tejido adiposo pardo, un tejido que participa en procesos de termorregulación en mamíferos, promueve la expresión y actividad de enzimas que participan en el proceso de termogénesis como la enzima desacoplante 1 (UCP1), la actividad de la desiodasa tipo 2 (D2), e incrementa el consumo de oxígeno, un indicador de actividad metabólica (Martinez-deMena et al., 2014).

Las hormonas tiroideas, triiodotironina (3,3',5-triiodotironina, T3) y la tiroxina (3,3',5,5-tetraiodotironina, T4), las hormonas efectoras del eje tiroideo, son liberadas de la glándula tiroides en diferentes proporciones, la T4 es liberada en mayor proporción con un 80% aproximadamente, mientras el 20% restante es la T3 y esta última es considerada la hormona activa. Aunque las hormonas tiroideas son de naturaleza liposoluble, estas son transportadas al interior y al exterior de la célula a través de varios transportadores específicos que actúan a través de un mecanismo dependiente de energía (Visser et al., 2008). Estos transportadores no solo ingresan y egresan hormona de sus células blanco, sino que también permite pasar hormonas de un compartimento a otro: por ejemplo, de la circulación al sistema nervioso central. Se han descrito diferentes transportadores para las hormonas tiroideas, entre ellos algunos miembros de la familia de los polipéptidos

transportadores de aniones orgánicos (OATP's, por sus siglas en ingles), algunos transportadores de aminoácidos y de la familia de transportadores de monocarboxilatos (MCT, por sus siglas en ingles), la translocasa de ácidos grasos, entre otros, pero solo OATP1C1, MCT8 y MCT10 muestran alta afinidad para las hormonas tiroideas (Hennemann et al., 2001., Visser et al., 2008). De estos, solo el transportador OATP1C1 se encuentra expresado en el plexo coroideo y en la barrera hematoencefálica (Suguyama et al., 2003) indicando su papel en el transporte de las hormonas tiroideas de la circulación a cerebro, El MCT8 se encuentra expresado en el plexo coroideo, los tanicitos de la eminencia media y la barrera hematoencefálica (Heuer et al., 2005., Alkemade et al., 2011) y evidenció su papel en el transporte de las hormonas tiroideas ya que mutaciones en el gen que codifica esta proteína tiene efectos clínicos en humanos asociados a la falta de hormonas tiroideas caracterizados por un retardo psicomotor severo y conocido como síndrome Allan-Herndon-Dudley (Schwartz et al., 2005). En el ratón, la deficiencia del gen de MCT8 no muestra efectos neurológicos evidentes, pero el ratón con una doble mutación (mutación en el gen de MCT8 y de OATP1C1) muestra anormalidades locomotoras, sugiriendo que en humanos, el transporte de hormonas tiroideas al cerebro se lleva a cabo principalmente por MCT8, mientras que en el ratón se lleva a cabo por MCT8 y por OATP1C1 (Mayerl et al., 2014).

Adicionalmente existen unas enzimas llamadas desiodasas que se encargan de metabolizar a las hormonas tiroideas; la desiodasa 1 (D1) y la desiodasa 2 (D2) catalizan la monodeiodinación del Iodo 5'externo, convirtiendo la T4 en T3. Por otro lado, la desiodasa 3 (D3) se encarga de la monodeiodinación del Iodo 5'interno generando T3 reversa (T3r), un producto con baja actividad biológica. En algunos casos se puede generar diiodotironina (3,5-T2) que se creía era un metabolito sin actividad biológica aunque recientemente ha demostrado tener diversos efectos biológicos (Orozco et al., 2014). Las desiodasas tienen un patrón de regulación que depende de la ontogenia del organismo y se expresan diferencialmente en los tejidos (Bates et al., 1999). Finalmente, las hormonas tiroideas llevan a cabo sus efectos mediante su unión a receptores de hormonas tiroideas (TRs, por sus siglas en inglés), codificados por dos distintos genes y que por splicing alternativo generan 4 receptores funcionales denominados TR α 1, TR α 2, TR β 1 y TR β 2 (Cheng et al.,

2010). Si bien existen varias subunidades, es la del TR β 2 la encargada de participar en la regulación negativa del eje tiroideo mediante la inhibición de la expresión del gen de TRH en el NPV y de la expresión de las subunidades que codifican para el heterodímero de la TSH (subunidad α y subunidad β) (Lechan y Fekete., 2014).

Finalmente, el eje tiroideo está sujeto a un mecanismo de retroalimentación negativa, es decir, cuando las hormonas tiroideas se encuentran bajas en la circulación, la síntesis de TRH y TSH aumentan en el NPV y la pituitaria anterior, respectivamente, para mantener hormonas tiroideas circulantes constantes, por el contrario, si las hormonas en la circulación se encuentran elevadas, estas son capaces de inhibir directamente la síntesis de TRH y TSH (Lechan y Fekete., 2014). En una condición crónica de hormonas tiroideas circulantes elevadas, se considera que el sujeto está hipertiroides, y las manifestaciones son un aumento en la pérdida de peso, un aumento del gasto energético basal, aumento de la lipólisis y aumento de la gluconeogénesis. Por el contrario, bajas concentraciones de hormonas tiroideas (hipotiroidismo) están asociadas a un aumento en la ganancia de peso, disminución del gasto energético basal, aumento en las concentraciones de colesterol, disminución de la lipólisis y de la gluconeogénesis (Mullur et al., 2014). Algunos de los efectos más conocidos de altas concentraciones de hormonas tiroideas en la circulación (hipertiroidismo) son un aumento en la pérdida de peso, un aumento del gasto energético basal, aumento de la lipólisis y aumento de la gluconeogénesis, mientras que por el contrario, bajas concentraciones de hormonas tiroideas (hipotiroidismo) están asociadas a un aumento en la ganancia de peso, disminución del gasto energético basal, aumento en las concentraciones de colesterol, disminución de la lipólisis y de la gluconeogénesis (Mullur et al., 2014). Algunos de los efectos de las hormonas tiroideas se deben a que activan del sistema nervioso autónomo; por ejemplo, el aumento de los niveles de glucosa en sangre debidos a la gluconeogénesis se deben a que las hormonas tiroideas activan a neuronas pre-autónomas del NPV, que a su vez interactúa con el sistema autónomo afectando el funcionamiento del hígado, sitio donde se lleva a cabo la gluconeogénesis (Klieverick et al., 2009). En conclusión, el eje hipotálamo-pituitaria-tiroides es activado centralmente por la TRH que a su vez induce la síntesis y liberación de TSH en la pituitaria, la TSH a su vez se une a su receptor localizado en la tiroides (figura 3). Esto induce la síntesis y liberación

de hormonas tiroideas que serán transportadas, biotransformadas para finalmente unirse a sus receptores nucleares y de esta manera regular positiva- o negativamente la síntesis de proteínas *de novo*

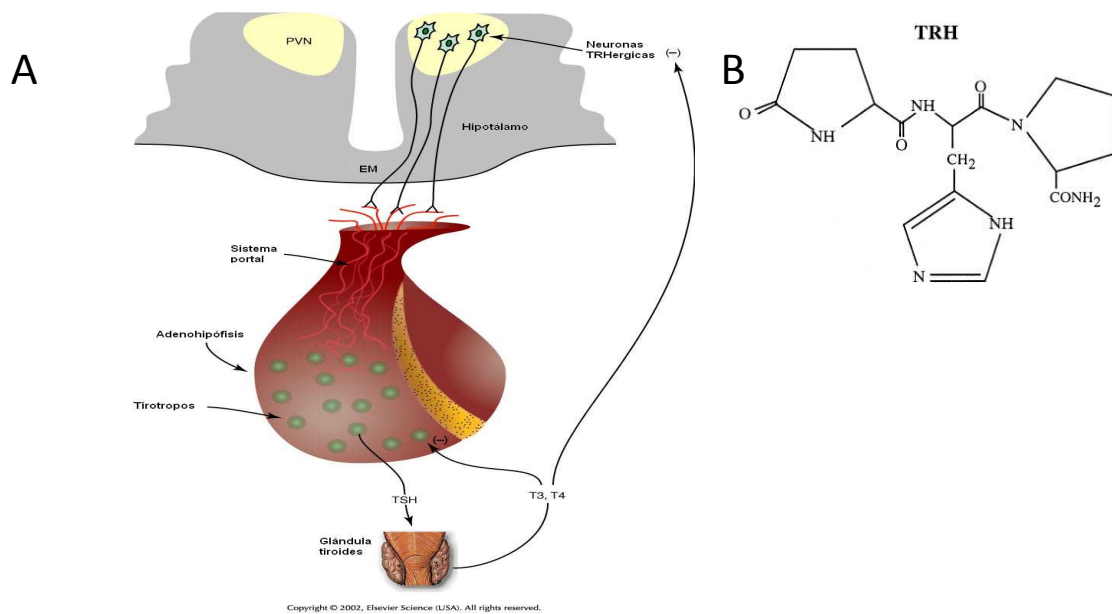


Figura 3.- El eje hipotalámico-adenohipofisiario-tiroideo. A.- El TRH es sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo. Ante un estímulo fisiológico, las terminales nerviosas de estas neuronas ubicadas en la eminencia media liberan el péptido hacia el sistema portal, lo que permite que sea transportado a la adenohipófisis donde induce la liberación de tirotropina. La tirotropina secretada llega a la tiroides y estimula la liberación de T3 y T4. NPV: Núcleo paraventricular; EM: eminencia media. Tomado y modificado de Squire et al., 2003. B.- La hormona liberadora de tirotropina. El TRH es un tripéptido de secuencia piroglutamil-histidil-prolinamida (pGlu-His-ProNH₂). Tomado de Cummins y O'Connor, 1998.

2.5.- Respuesta del eje adrenal al ayuno

Ya que el eje adrenal ha mostrado regular algunos aspectos del eje tiroideo durante el ayuno (que se describirá más adelante), cabe mencionar generalidades del eje adrenal y su respuesta ante el ayuno. La corticosterona es una hormona de naturaleza esteroidea sintetizada y liberada por la glándula adrenal y con múltiples blancos tanto a nivel central, como periférico. Esta hormona se libera en respuesta a la activación del eje adrenal,

mediante incremento en la síntesis y liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en el NPV del hipotálamo que a su vez estimula la liberación de hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la pituitaria anterior y que finalmente estimula la síntesis y liberación de corticosterona en la glándula adrenal. En el ayuno esta hormona incrementa su concentración plasmática y promueve la utilización de aminoácidos como fuente de glucosa (Tischler et al., 1998). El aumento de esta hormona se explica en parte por la activación del eje adrenal, puesto que el ayuno promueve un aumento en el RNAm de CRH en el NPV y del RNAm del marcador de respuesta neuronal c-Fos (Timofeeva y Richard., 1997). Otros mecanismos, como el decremento de su metabolismo en el hígado en respuesta al ayuno parecen explicar este incremento (Woodward et al., 1991).

3.- Antecedentes particulares

3.1.- El eje tiroideo durante el ayuno

Uno de los eventos fisiológicos que regulan el eje tiroideo más estudiados es la completa privación de alimento ó ayuno (se le puede encontrar como “fasting” ó “starvation” en ingles) y en menor grado, la restricción de alimento (que consiste en disminuir la cantidad de alimento que un animal consume habitualmente). Se ha demostrado que el ayuno disminuye la función del eje tiroideo, provocando cambios en cada uno de los órganos que participan en este eje (Sainsbury et al., 2011), como puede evidenciarse en la baja de los niveles del RNAm de TRH en el núcleo paraventricular, de la concentración sérica de TSH, y de hormonas tiroideas circulantes, lo que se ha interpretado como una respuesta adaptativa para reducir el metabolismo y el gasto energético en condiciones de baja disponibilidad de energía (Blake et al., 1991, Légrádi et al., 1997). Los primeros estudios en humanos realizados alrededor de 1970 mostraron una bajada de los niveles séricos de las hormonas T4 y T3 en personas con anorexia o en sujetos sanos sometidos a 5 días de ayuno (Hurd et al., 1977, Harris et al., 1978, Komaki et al., 1986). La disminución de hormonas tiroideas en la circulación ante el ayuno se explican, además de la inhibición del eje tiroideo, a un aumento en su metabolismo y degradación por sulfatación (Vella et al., 2014), aumento en la expresión de la D3 del hígado, la enzima de que inactiva a la T3, así como un aumento en el contenido de hormonas tiroideas en los tejidos (Galton et al., 2014).

En cuanto a la concentración de TSH en la sangre, algunos investigadores encontraron cambios pero otros no (Carson et al., 1977, Portnay et al., 1974), probablemente debido a los diferentes protocolos utilizados en las investigaciones, pero también posiblemente al hecho de que la bioactividad de la TSH pueda cambiar por modificaciones de su glicosilación sin que sea detectable por un radioinmunoensayo (Weintraub et al., 1989). Estudios posteriores en ratas y ratones mostraron resultados similares, aunque los efectos en roedores fueron más profundos. En esta especie no solo se analizó el efecto del ayuno sobre las hormonas circulantes, en donde las concentraciones de tirotropina, T3 y T4 mostraron claras disminuciones en la circulación en periodos de 48 a 64 horas de ayuno, sino que también se analizó la expresión del RNA mensajero de la tirotropina y los niveles del RNA mensajero de TRH en el NPV en los mismos periodos de ayuno, encontrando que estos estaban también disminuidos (Blake et al., 1981., Shi et al., 1993, Légrádi et al., 1997). Hoy se sabe además que la realimentación revierte estos cambios. Por ejemplo, tras un ayuno y la posterior realimentación, se restaura la expresión del RNAm de TRH en el NPV, la expresión de la TSH en la pituitaria y la concentración de tirotropina en la circulación (Boelen et al., 2006, Sánchez et al., 2008).

Por otro lado, en modelos de restricción alimentaria, se observan respuestas del eje tiroideo cuyo sentido es similar, tanto a nivel del RNA mensajero de TRH en el NPV, como a nivel de las hormonas periféricas del eje (Jaimes-Hoy et al., 2007). Por lo tanto, se infiere que en respuesta al ayuno ó a la restricción, la disminución de la actividad de las neuronas TRHérgicas contribuye a la caída de los otros marcadores del eje. Sin embargo, efectos al nivel de otros órganos como la pituitaria o la tiroides pudieran también contribuir al ajuste del eje. Estos datos llevaron rápidamente a los investigadores a intentar dilucidar los mecanismos que llevan al ajuste a la baja del eje.

3.2.- Mecanismos de control del eje tiroideo en el ayuno

Las neuronas del núcleo arcuato proyectan a zonas del hipotálamo que controlan la ingesta de alimentos como el hipotálamo lateral, el hipotálamo dorsomedial y hacia los somas de neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) (Bouret et al., 2004), donde se sintetiza la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que controla la activación del eje

tiroideo (Lechan y Fekete 2014., Sainsbury et al., 2013). Por lo tanto, el núcleo arcuato es una región que controla la actividad del eje tiroideo de acuerdo al balance de energía. La administración central de glucosa o insulina durante el ayuno, no revierten la bajada de la expresión del RNAm de TRH, mientras que la administración de leptina, si revierte esta bajada regresando el RNAm de la TRH a valores control, indicando que parte de los cambios ocurridos en el ayuno con el eje tiroideo se deben a la bajada leptina circulante (Fekete et al., 2006). Lesiones en el núcleo arcuato abaten la caída del mRNA de TRH en el NPV en el ayuno (Legradi et al., 1998), sugiriendo el papel de las melanocortinas en esta regulación. Consistente con esto, CART y α -MSH ha mostrado tener proyecciones hacia el PVN y tienen un efecto positivo sobre el mRNA de la TRH del NPV cuando se administra centralmente y durante el ayuno, cuando ambos son regulados negativamente, la administración central de CART y α -MSH revierte la caída del mRNA de la TRH (Fekete et al., 2000a., Fekete et al., 2000b). Por el contrario, se ha demostrado que el Agrp y el NPY inhiben la síntesis del RNAm de la TRH en el PVN cuando se inyectan centralmente (Fekete et al., 2002). AgrP actúa como un antagonista de receptor a α -MSH, y en el ayuno, cuando AgrP aumenta, incrementa su efecto antagónico sobre la acción positiva de α -MSH sobre el eje tiroideo (Fekete et al., 2002). Por lo tanto, el núcleo arcuato, a través de las subpoblaciones POMC/CART, AgrP/NPY regulan al eje tiroideo en el ayuno.

3.2.1.- Papel de la leptina

En cuanto a los mecanismos que inician la inhibición del eje tiroideo durante el ayuno, la leptina fue la primera hormona en postularse como parte de los mecanismos regulatorios ya que se encontró que el ayuno disminuye la actividad de varios ejes neuroendócrinos, pero la administración exógena de leptina durante el periodo de ayuno revierte estos efectos (Ahima et al., 1996). La leptina es liberada del tejido adiposo, cruza la barrera hematoencefálica y actúa sobre el núcleo arcuato que expresa el receptor biológicamente activo a leptina (Håkansson et al., 1998) y la administración exógena de leptina durante un ayuno (para evitar la caída de esta hormona) revierte la caída del mRNA de TRH en el NPV y de las concentraciones séricas de TSH (Légradi et al., 1997). El mecanismo de regulación de la leptina sobre la actividad del mRNA de TRH es indirecto, ya que una vez que la leptina cae en el ayuno, las neuronas del núcleo arcuato que expresan al NPY/AgRP

son activadas, y en paralelo, la otra subpoblación del núcleo arcuato que expresa CART/POMC son inhibidas, esto da como resultado un incremento en la liberación de NPY y AgRP que tiene efecto inhibitorio sobre las neuronas de TRH en el NPV concomitantemente con el decremento en la liberación de α -MSH en el PVN (Lechan y Fekete et al., 2014)

3.2.2.- Papel de las hormonas tiroideas y desiodasas en la inhibición del eje tiroideo durante el ayuno

En el ayuno, cuando las hormonas tiroideas circulantes se encuentran disminuidas, el mecanismo de retroalimentación negativa para el eje tiroideo mencionado anteriormente no opera, por ejemplo, a una disminución de hormonas tiroideas, se espera un aumento en el RNAm de TRH y mayor TSH en la circulación. Para explicar esta paradoja, se ha postulado que la D2 de los tanicitos aumenta su expresión y actividad en el hipotálamo durante el ayuno, dando como resultado un aumento concentración local de T3 promoviendo la inhibición del gen de TRH (Diano et al., 1998). En muchas regiones, incluyendo el cerebro, el rol primario de la D2 es proveer la concentración local de T3 adecuada, si la disponibilidad de T3 y T4 declinan en la circulación sanguínea y permitiendo a los tejidos blanco llevar a cabo funciones dependientes de hormonas tiroideas (Lechan y Fekete 2014). No obstante, recientemente se ha re debatido el papel de la D2 de los tanicitos en la regulación del eje tiroideo durante el ayuno (Lechan y Fekete., 2014). Un reciente reporte además no encuentra cambios en la actividad de D2 durante el ayuno (Galton et al., 2014). Por lo tanto, el papel de la D2 y las concentraciones de T3 locales debe ser reevaluado y comprobado.

3.2.3.- Papel de la corticosterona

La corticosterona, un producto de la activación del eje adrenal ha mostrado regular diferentes elementos del eje tiroideo a varios niveles. Por ejemplo, la adrenalectomía aumenta la expresión del mRNA de TRH en el núcleo paraventricular, mientras que la administración exógena de corticosterona o dexametasona inhibe la síntesis (Kakucska et al., 1995). Por otro lado, se ha demostrado que la corticosterona inhibe la secreción de TSH en respuesta a la administración de TRH exógeno (Brabant et al., 1989). Por tanto, la

corticosterona inhibe al eje tiroideo a nivel del NPV y a nivel de la pituitaria anterior. Finalmente la corticosterona tiene un efecto permisivo en cuanto al aumento de la actividad de la D2 en el hipotálamo, ya que la remoción de la glándula adrenal en conjunto con la prevención de la caída de leptina durante el ayuno previenen el aumento de la D2 en el hipotálamo mediobasal, mientras la simple adrenalectomía o la simple administración de leptina no generan durante el ayuno, no generan este cambio. Por tanto, se requiere el aumento de la corticosterona y la caída de leptina de manera concomitante para permitir el cambio en la actividad de la D2 (Coppola et al., 2005).

3.3.- Efecto del ayuno en ratas hembra

Todos los experimentos descritos en relación a las respuestas de los componentes del eje tiroideo al ayuno, han sido practicados principalmente en modelos experimentales (por ejemplo, rata, ratón y humano) del género macho. No obstante hay algunos estudios puntuales que han estudiado el impacto del ayuno sobre la actividad del eje tiroideo en machos y en hembras, utilizando como modelo la completa privación de alimento (ayuno) y la restricción alimentaria. En un experimento realizado en ratas hembra de dos meses de edad de la cepa Wistar substrain (R-Amsterdam), se mostró que, el efecto del ayuno, al igual que en los machos, disminuye la expresión del mRNA de la TRH, la bajada en la expresión de la subunidad β -TSH, así como de T4 y T3 libre y total, así como un aumento en la concentración sérica de corticosterona, pero la TSH sérica no cambió (Haasteren et al., 1996). En otro experimento, realizado con ratas hembra adultas de la cepa Sprague-Dawley, fueron sometidas a 2 y 6 días de ayuno y se compararon respecto a un control que recibió agua y alimento ad libitum. No se observaron cambios en la TSH circulante y aunque se observa una disminución en el contenido de TSH por pituitaria, esto se atribuye a una pérdida de peso de esta glándula que va de 10.8 ± 0.5 a 8.3 ± 0.3 mg por pituitaria (Connors et al., 1985). En cuanto a la respuesta de T3 y T4, no se observan cambios en el plasma a las 48 horas, solo se encuentran efectos si se someten a 166 horas de ayuno, sugiriendo que la respuesta del eje tiroideo al ayuno es más tardía en hembras que en machos. En otra investigación independiente, 5 días de ayuno resultó en una disminución de TSH y T4 en machos, pero las hembras no mostraron cambios importantes

en estos parámetros (Cohen et al., 1989). Por otro lado, van Hassteren y colaboradores compararon el efecto de la restricción de alimento por 21 días (dando a los animales solo un tercio de alimento de lo que consumen habitualmente) entre machos y hembras. Encontraron que en ambos géneros, hay un incremento de corticosterona, decremento de la TSH circulante, de T4 y T3 libre, sin embargo el RNAm de la TRH del hipotálamo no cambia (van Hassteren et al., 1996). En conclusión, el ayuno parece impactar en menor medida el eje tiroideo en las hembras, mientras que la restricción alimentaria, afecta al eje tiroideo en ambos géneros.

3.4.- Degradación de la TRH

3.4.1.- Degradación de la TRH por enzimas citosólicas

La inactivación de neuropéptidos se lleva a cabo principalmente por ectopeptidasas (enzimas con su sitio catalítico dirigido hacia el espacio extracelular). Varias evidencias sugieren que la degradación enzimática es uno de los mecanismos responsables de regular la señal del TRH. Estudios iniciales mostraron que dos enzimas citosólicas pueden degradar al TRH *in vitro*: la prolil endopeptidasa (PE; EC 3.4.21.26) y la piroglutamil aminopeptidasa I (PPI; EC3.4.11.8) (O'Leary y O'Connor, 1995). La PE es una enzima de tipo serin proteasa que tiene un peso molecular de 70 kDa. Esta enzima hidroliza un amplio espectro de sustratos por el carboxilo terminal de la prolina (a excepción del enlace Pro-Pro). Sus sustratos incluyen un gran número de neuropéptidos tales como: la angiotensina I y II, la sustancia P, la neurotensina, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el TRH (Walter, 1976). Por su parte, la PPI es una enzima monomérica de peso molecular variable (de 22 a 60 kilodaltones, dependiendo de la fuente) y un pH óptimo entre 6.5 y 8.5 (Cummins y O'Connor, 1998). La PPI ha sido purificada a partir de la fracción soluble de distintos tejidos de mamífero, incluyendo el cerebro de bovino, de rata, de ratón y de cuyo, la adenohipófisis de bovino y de rata, el hígado de rata, la corteza cerebral humana y el riñón humano (Cummins y O'Connor, 1998). Ya que la PPI es una tiol proteasa, su actividad puede ser inhibida por agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo, tales como N-etilmaleimida, PBC y 2-iodoacetamida (Cummins y O'Connor, 1998). La PPI hidroliza un amplio espectro de sustratos con residuo pGlu en el extremo amino terminal de los

péptidos. Estos sustratos incluyen al TRH, GnRH, a la neurotensina y otros sustratos sintéticos (Cummins y O'Connor, 1998). La inhibición selectiva con inhibidores específicos, tanto de la PE como de la PPI, no cambia el contenido ni la liberación de TRH *in vitro* e *in vivo* en cerebros de roedores (Charli et al., 1987; Mendez et al., 1990). La localización citosólica de estas enzimas, su amplio espectro de sustratos, su distribución y el hecho de que ambas enzimas no actúan en el espacio extracelular, sugieren que estas enzimas (PE y PPI) juegan un papel en el catabolismo de péptidos intracelulares, más que funcionar como enzimas reguladoras de la actividad del TRH u otros neuropéptidos.

3.4.2.- Degradación de la TRH por la piroglutamil peptidasa II

Desde hace tiempo se ha reconocido a la enzima piroglutamil peptidasa II (PPII) como una enzima capaz de hidrolizar el enlace pGlu-His de la molécula de TRH en el espacio extracelular. Previo a la obtención de la secuencia primaria de la PPII, ya se suponía que la actividad de PPII dependía de algún metal, ya que la actividad se inhibe cuando se agregan quelantes de metal (Bauer et al., 1981). La secuencia proteica de esta enzima solo ha podido ser deducida a partir de la secuencia de fragmentos de la proteína y su posterior clonación a DNAc, pero concuerda con el supuesto de que es una ectopeptidasa dependiente de zinc. La PPII muestra además una topología que la sitúa estratégicamente para reconocer al TRH e hidrolizarlo en el espacio extracelular, por ejemplo, en las sinapsis del cerebro donde el TRH ha mostrado múltiples efectos farmacológicos (Gary et al., 2003). La PPII corresponde a una proteína integral de membrana tipo II de 1025 aminoácidos en la rata. Así mismo, se ha propuesto la siguiente topografía: una región N-terminal intracelular; una región transmembranal; y una gran región extracelular con la secuencia consenso His-Glu-X-X-His y un segundo Glu separado por 18 aminoácidos característicos de las zinc metalopeptidasas. El dominio extracelular incluye, además del dominio catalítico, un dominio C terminal, y 12 sitios posibles de N-glicosilación (Schauder et al., 1994) (figura 3). Cabe mencionar que además del cerebro, la PPII se encuentra expresada en mucha menor concentración en regiones como la adenohipófisis y el hígado (Vargas et al. 1987).

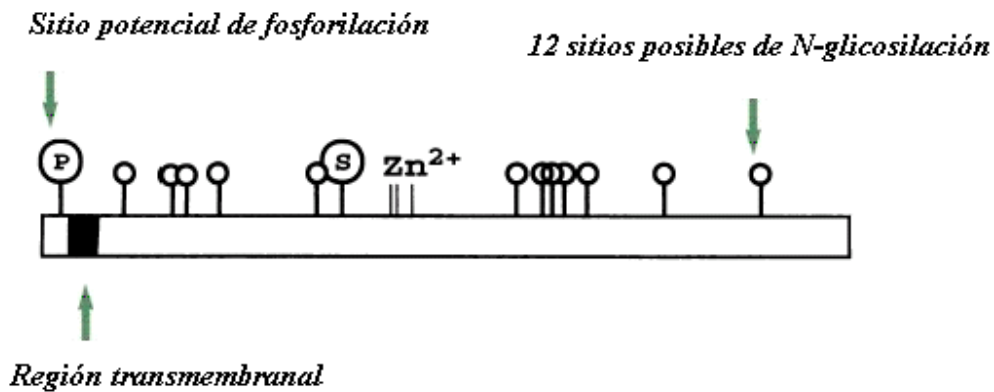


Figura 4.- Topografía de la PPII deducida a partir del DNAC del gen de la PPII. S: Sitio posible de sulfatación. Tomado y modificado de Schauder et al., 1994.

3.4.3.- Degradación de la TRH por una enzima presente en suero

El hígado genera una isoforma soluble de la PPII llamada tiroliberinasa que es secretada a la circulación general (Schmitmeier et al., 2002). Previo a este conocimiento, Bauer y Nowak identificaron y purificaron a partir de suero de rata, una enzima que hidroliza la unión peptídica entre el pGlu-His del TRH (Bauer y Nowak, 1979). Se encontró que la enzima es diferente de la enzima citosólica PPI pues las características bioquímicas son muy distintas. La enzima de suero no es inhibida por agentes bloqueantes de grupos sulfhidrilo, pero es inhibida por quelantes de metal (lo que sugiere que es una metaloproteasa), su actividad es óptima a pH neutro y además tiene un peso molecular de 260 kDa, un peso mucho mayor que el de la PPI. Estudios llevados a cabo para determinar su especificidad mostraron que esta enzima era altamente específica para el TRH y péptidos sintéticos semejantes al TRH (Bauer y Nowak, 1979), ya que otros péptidos que contienen el pGlu en el extremo amino terminal tales como la neurotensina o el LHRH no son sustrato de esta enzima. A consecuencia de tal selectividad, esta enzima fue llamada "Tiroliberinasa" (el TRH también era conocido como tiroliberina). Se ha comprobado que en el suero, el TRH es degradado principalmente por la tiroliberinasa (Frideman y Wilk, 1985), por lo que se ha sugerido que *in vivo*, la tiroliberinasa inactiva al TRH en el sistema portal, en donde el TRH entra en contacto con la sangre (Charli et al., 2006).

2.4.4.- Degradación de la TRH por la PPII de adenohipófisis

Aunque se puede encontrar actividad de PPII en la pituitaria anterior (Vargas et al., 1987), existen evidencias de que esta enzima se expresa en subpoblaciones celulares no relacionadas con la secreción de TSH. Mediante el enriquecimiento de las subpoblaciones celulares de esta región, se encontraron evidencias de que esta enzima está presente solo en lactótrofos (células de la pituitaria anterior que sintetizan y liberan prolactina) pero no en tirótrofos (células de la pituitaria anterior que sintetizan y liberan TSH) (Bauer et al., 1990). Aunado a esto, mediante el uso de hibridación in situ (ISH) para el RNAm de la PPII y el empleo de inmunohistoquímica para las hormonas prolactina y tirotropina, se encontró que ningún tirótrofo expresa el RNAm de la PPII y que únicamente el 10 % de los lactótrofos expresa el RNAm de la enzima (Cruz et al., 2009). Además, la inhibición de la PPII en cultivos primarios de adenohipófisis potencia el efecto de TRH sobre la liberación de prolactina, pero la inhibición no afecta la liberación de TSH. Esto sugiere que la enzima PPII de esta región no participa en el control de la acción de TRH sobre la secreción de TSH (Cruz et al., 2009). No obstante, esta región es la más estudiada en cuanto a los mecanismos que regulan su expresión y actividad. En la ontogenia de la rata, la expresión de la PPII de adenohipófisis coincide con la maduración de la eminencia media, la aparición de los lactótrofos así como la detección de hormonas tiroideas y la prolactina en suero (Vargas et al., 1992). En el ciclo circadiano de las ratas, se demostró que la actividad y el RNAm de la PPII fluctúan durante el día, y que algunas de estas fluctuaciones se deben a las variaciones en la actividad secretoria de las neuronas TRHérgicas (Vargas et al., 1994). Durante el ciclo estral, la actividad de esta enzima es variable, posiblemente por las fluctuaciones en los niveles de estrógenos durante este ciclo (Uribe et al., 1991). Consistente con este hecho, la administración exógena de 17β -estradiol disminuye la actividad específica y el RNAm de la PPII de adenohipófisis *in vitro* e *in vivo* (Bauer, 1988). De manera opuesta, las hormonas tiroideas aumentan la actividad específica y el RNAm de la PPII de adenohipófisis *in vivo* (Bauer., 1987., Bauer, 1988). Mediante el empleo de cultivos primarios de adenohipófisis se demostró que los efectos de las hormonas tiroideas ocurren directamente sobre la enzima PPII ubicada en esta glándula (Bauer et al., 1990). Algunos factores hipotalámicos que controlan la secreción de prolactina como la somatostatina, la dopamina y el TRH regulan la actividad de la PPII *in*

vitro. Por ejemplo, la dopamina (que inhibe la síntesis y liberación de prolactina) aumenta la actividad de la PPII (Vargas et al., 1998). El TRH por sí mismo, así como el [3-Me-His(2)]-TRH (un potente agonista del receptor del TRH), disminuyen la actividad de la PPII de adenohipófisis y los niveles del ARNm de la enzima tanto *in vitro* como *in vivo* (Vargas et al., 1994; Vargas et al., 2002). Estos datos sugieren que múltiples factores hipotalámicos que regulan la secreción de prolactina también ejercen efectos regulatorios sobre la actividad de la PPII.

3.5.- Papel de la PPII de los tanicitos en el control del eje tiroideo

Los tanicitos de la eminencia media están enriquecidos con elementos regulatorios del eje tiroideo, como transportadores de hormonas tiroideas, receptores de hormonas tiroideas, y la desiodasa tipo D2 (Rodríguez et al., 2005, Tu et al., 1995). En particular, los somas de los tanicitos $\beta 2$ se encuentran en la base del tercer ventrículo y tienen extensiones citoplasmáticas que cruzan la eminencia media y tienen íntimo contacto con las terminaciones nerviosas que liberan algunas neurohormonas cuyo blanco es la adenohipófisis. En cuanto a la expresión de la PPII en la eminencia media, estudios de hibridación *in situ* mostraron la presencia del RNAm de la PPII sobre la pared del tercer ventrículo, en la región del hipotálamo mediobasal (Heuer et al., 1998). Mediante doble marcaje, utilizando hibridación *in situ* contra el RNAm de la PPII e inmunocitoquímica contra la proteína vimentina, se demostró que la PPII se expresa en los tanicitos, hallazgo novedoso ya que hasta entonces se pensaba que en el cerebro, la PPII se expresaba solamente en neuronas (Sánchez et al., 2009). Datos no publicados indican que este RNA se traduce a una proteína detectable en las paredes inferiores del tercer ventrículo (Figura 5). Además, la proteína genera una actividad enzimática significativa en la eminencia media, donde la actividad específica es mucho mayor que en los núcleos cercanos y la incubación de rebanadas hipotalámicas en presencia de un inhibidor contra la PPII permite una mayor recuperación de TRH en el medio (Sánchez et al., 2009).



Figura 5.-Inmunohistoquímica dirigida a la enzima PPII en la eminencia media de la rata. Se muestra una inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo anti-PPII y revelada con diaminobenzidina que muestra señal positiva (señal café) en la zona donde se encuentran los tanicitos $\beta 1$ y $\beta 2$ de la eminencia media de la rata.

En el estudio de Sánchez et al., 2009 se demostró que la inhibición de la actividad de la enzima incrementa la concentración sérica de TSH, cuando los animales están sometidos a un estrés por frío. Se sabe que el frío activa las neuronas del núcleo paraventricular que expresan TRH activando el eje tiroideo (Uribe et al., 1993). Este hallazgo demostró que la PPII de los tanicitos puede controlar la cantidad de TRH que llega a la adenohipófisis, y por lo tanto la secreción de tirotrópina (Sánchez et al., 2009) (figura 6). En esta zona, se ha observado que la actividad de la enzima en los tanicitos es regulada positivamente por hormonas tiroideas en la rata (Sánchez et al., 2009).

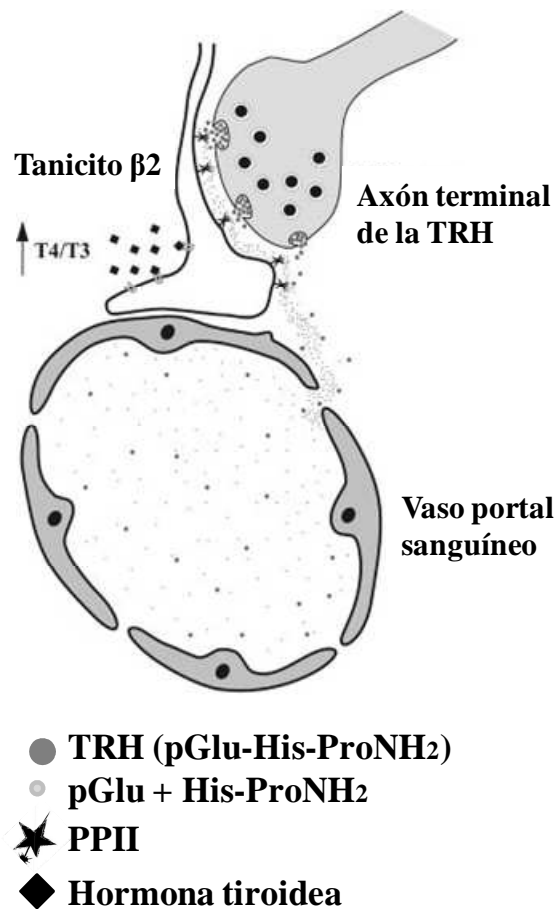


Figura 6.- Mecanismo propuesto para el papel de la PPII que se expresa en los tanicitos $\beta 2$ de la eminencia media. Una vez liberada de sus terminales axónicas, la TRH es degradada (generando pGlu+His-ProNH₂) por la PPII de los tanicitos en espacio periportal en respuesta a altos niveles de hormonas tiroideas, reduciendo la cantidad de TRH que es transportada en el sistema portal y consecuentemente, la liberación de TSH. Tomado y modificado de Sánchez et al., 2009)

El hipertiroidismo induce una rápida bajada de TSH en la circulación, bajo este paradigma, Marsily y colaboradores reportaron en el ratón que la administración de T4 y T3 inducen un aumento en la expresión del RNAm de PPII en los tanicitos, y que este aumento es previo a la caída del RNAm de TRH inducido por la administración de hormonas tiroideas. Por lo tanto, el aumento de la expresión de PPII en los tanicitos es un evento que ocurre previo a la caída del RNAm de la TRH, contribuyendo a la degradación de TRH y promoviendo la rápida disminución de TSH que se observa en el hipertiroidismo (Marsily et al., 2011). Este

aumento de la expresión de PPII en tanicitos por T4 no ocurre en el ratón al que genéticamente se le ha abatido a la D2, pero si cuando se le administra T3, sugiriendo que la conversión de T4 a T3 por la D2 es necesaria para la regulación de esta enzima (Marsily et al., 2011). Estos datos sugieren que el control de la actividad de la PPII en la eminencia media es uno de los blancos de la retroalimentación negativa por hormonas tiroideas. El ejercicio como modelo experimental en roedores, ha mostrado modificar varios elementos del eje tiroideo (Fortunato et al., 2008., Uribe et al., 2014). En particular, en el ejercicio voluntario (donde se deja a los roedores con una rueda para correr y ellos suben voluntariamente) se ha encontrado que el RNAm de la PPII no cambian, a pesar de los aumentos del RNAm y de la actividad de D2 (y probablemente de T3 local) en la eminencia media, sugiriendo que, en esta condición, el aumento de T3 local no es suficiente para inducir el aumento de la expresión del RNAm de PPII dependiente de hormonas tiroideas.

4.- Planteamiento del problema

Varios de los elementos del eje tiroideo han sido analizados durante el ayuno, pero hasta ahora no se ha estudiado cual es el efecto de esta condición sobre la PPII de la eminencia media. Este trabajo se enfoca en el análisis de la expresión y actividad de una enzima llamada piroglutamil peptidasa II (PPII), la ecto-enzima que inactiva a la hormona liberadora de tirotropina, cuya síntesis y liberación por parte de neuronas del hipotálamo permiten la activación del eje tiroideo. Se ha propuesto que la actividad de la PPII en la eminencia media, el sitio donde se liberan las neurohormonas hipotalámicas, controla la cantidad de TRH que puede llegar a la pituitaria anterior ó adenohipófisis (Sánchez et al., 2009) (figura 6). Proponemos que, en conjunto con otros mecanismos que afectan las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo (Fekete y Lechan 2007), la expresión y actividad de esta enzima aumenta en el ayuno disminuyendo así la cantidad de TRH que puede alcanzar la adenohipófisis. El objetivo de este trabajo es analizar el efecto del ayuno sobre la expresión y actividad de la PPII tres diferentes compartimientos relacionados con el eje tiroideo, dilucidar las moléculas extracelulares responsables y analizar si la actividad de la enzima repercute en el estatus del eje tiroideo en el ayuno.

5.- Hipótesis

Varios mecanismos aseguran que la inactivación del eje tiroideo se lleve a cabo durante un déficit energético. De acuerdo a los resultados preliminares, proponemos que podría existir adicionalmente a los cambios conocidos, un ajuste en la concentración de la actividad de PPII en la eminencia media que contribuye a la regulación central del eje tiroideo durante el ayuno. Este ajuste pudiera deberse a un incremento en la concentración local de T3, y/o a la caída de la leptina circulante y/o al aumento de corticosterona en el suero. Postulamos que la inhibición de la expresión de la PPII de los tanicitos durante el ayuno debería atenuar la caída de la actividad del eje tiroideo.

6.- Objetivos

Objetivo principal

Definir el papel que desempeña la PPII de tanicitos en el estatus del eje tiroideo durante un ayuno.

Particulares

- 1) Estudiar el efecto del ayuno sobre la expresión y actividad de la PPII en los tanicitos.
- 2) Determinar si alguno de los reguladores extracelulares conocidos del eje está involucrado en la regulación de la expresión y actividad de PPII de tanicitos en el ayuno.
- 3) Determinar si durante el ayuno, la inhibición de la expresión y/o actividad de la PPII, reduce la inhibición del eje tiroideo a nivel periférico.
- 4) Determinar el efecto del ayuno sobre la actividad de PPII en ratas adultas hembra

7.- Manuscrito requisito

Fasting Enhances Pyroglutamyl Peptidase II Activity in Tanycytes of the Mediobasal Hypothalamus of Male Adult Rats

Iván Lazcano, Agustina Cabral, Rosa María Uribe, Lorraine Jaimes-Hoy, Mario Perello, Patricia Joseph-Bravo, Edith Sánchez-Jaramillo, and Jean-Louis Charli

Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular (I.L., R.M.U., L.J.-H., P.J.-B., J.-L.C.), Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México; Laboratory of Neurophysiology (A.C., M.P.), Multidisciplinary Institute of Cell Biology (Argentine Research Council and Scientific Research Commission, Province of Buenos Aires), La Plata, Buenos Aires 1900, Argentina; and Dirección de Investigaciones en Neurociencias (E.S.-J.), Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, México D.F. 14370, México

Fasting down-regulates the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis activity through a reduction of TRH synthesis in neurons of the parvocellular paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). These TRH neurons project to the median eminence (ME), where TRH terminals are close to the cytoplasmic extensions of $\beta 2$ tanycytes. Tanycytes express pyroglutamyl peptidase II (PPII), the TRH-degrading ectoenzyme that controls the amount of TRH that reaches the anterior pituitary. We tested the hypothesis that regulation of ME PPII activity is another mechanism by which fasting affects the activity of the HPT axis. Semiquantitative *in situ* hybridization histochemistry data indicated that PPII and deiodinase 2 mRNA levels increased in tanycytes after 48 hours of fasting. This increase was transitory, followed by an increase of PPII activity in the ME, and a partial reversion of the reduction in PVN pro-TRH mRNA levels and the number of TRH neurons detected by immunohistochemistry. In fed animals, adrenalectomy and corticosterone treatment did not change ME PPII activity 72 hours later. Methimazole-induced hypothyroidism produced a profound drop in tanycytes PPII mRNA levels, which was reverted by 3 days of treatment with T_4 . The activity of thyroliberinase, the serum isoform of PPII, was increased at most fasting time points studied. We conclude that delayed increases in both the ME PPII as well as the thyroliberinase activities in fasted male rats may facilitate the maintenance of the deep down-regulation of the HPT axis function, despite a partial reactivation of TRH expression in the PVN. (*Endocrinology* 156: 0000–0000, 2015)

The brain of vertebrates detects adverse environmental changes, as food deficit. Homeostatic responses to food restriction or fasting lead to adjustments in the activity of the neuroendocrine axes, which control growth and energy metabolism. During energy deficits, the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis is regulated through multiple tissue-specific changes (1). In the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN), food restriction or fasting decrease the expression of pro-TRH and of protein convertases 1/3 and 2, convertases that contribute to pro-TRH processing into mature peptide

(2–7). The concentration of TRH in both the median eminence (ME) and the hypothalamic portal blood, as well as the level of β -TSH mRNA in anterior pituitary, and the concentration of TSH in serum decrease during fasting (2, 5, 8–10). A negative energy balance is associated with decreased liver deiodinase 1 (D1) mRNA levels and activity (11–13) and increased catabolism of T_4 (14). These events lead to a dramatic reduction of serum T_3 and T_4 concentrations, which contribute to reducing energy expenditure when food reserves are low (8, 9).

ISSN Print 0013-7227 ISSN Online 1945-7170
Printed in USA
Copyright © 2015 by the Endocrine Society
Received November 4, 2014. Accepted May 1, 2015.
First Published Online May 5, 2015

Abbreviations: D1, deiodinase 1; D2, deiodinase 2; HPT, hypothalamus-pituitary-thyroid; IR, immunoreactive; ISH, *in situ* hybridization; MBH, mediobasal hypothalamus; ME, median eminence; PPII, pyroglutamyl peptidase II; PVN, paraventricular nucleus of the hypothalamus; UTP, uridine-5'-triphosphate.

Down-regulation of both TRH biosynthesis and release during fasting likely contributes to the decrease of TRH concentration in the hypothalamic portal blood, but TRH hydrolysis in the extracellular space likely adds another level of control. TRH is hydrolyzed *in vitro* by pyroglutamyl peptidase II (PPII) (EC 3.4.19.6; TRH-degrading ectoenzyme), a narrow specificity ectoenzyme (15). PPII is found in various brain regions, including the mediobasal hypothalamus (MBH) (16, 17). In the MBH, PPII is expressed in all tanyocyte subtypes (17), a specialized ependymal cell type that forms the central and ventral parts of the wall of the third ventricle. Although $\alpha 1$ and $\alpha 2$ tanyocyte subtypes send basal processes into the dorsomedial and ventromedial nuclei, the $\beta 1$ and $\beta 2$ tanyocyte subtypes are localized ventrally, and the $\beta 2$ tanyocytes project basal processes to the external layer of the ME (18). Functional evidence suggests PPII regulates TRH concentration in the ME extracellular space, before TRH reaches the anterior pituitary, and thus thyrotropin levels in serum (17). The expression and activity of PPII in the ME are up-regulated by thyroid hormones; these changes are faster than those operating on TRH synthesis in the PVN, and may contribute to the negative feedback that adjusts HPT axis activity (17, 19).

PPII is also expressed in the anterior pituitary, where its activity is regulated by multiple hypothalamic and peripheral factors, including thyroid hormones that up-regulate it (15, 20). In this tissue, PPII is not localized to thyrotrophs, and functional studies in cell culture indicate that it controls TRH effect on prolactin secretion, but not TRH effect on TSH secretion (21, 22). Additionally, a soluble PPII isoform, called thyroliberinase, is produced by the liver (23), and may hydrolyze circulating TRH. Thyroliberinase activity is up-regulated by thyroid hormones (24, 25), but the impact of negative energy balance conditions on the activity of this enzyme is unknown.

The current study aimed to test the hypothesis that PPII expression and activity in the ME of adult male rats is adjusted during fasting, as an additional mechanism to regulate HPT axis activity. The sensitivity of ME PPII expression and activity to thyroid and adrenal status was analyzed in fed animals. Additionally, we compared the dynamics of ME PPII expression and activity with pro-TRH synthesis in the PVN of fasted animals, and explored the effect of fasting on the activity of PPII in the anterior pituitary, serum and the parietal cortex.

Materials and Methods

Animals

Adult male Wistar rats were obtained from the animal care facility of Instituto de Biotecnología, except that for experiment

5, Wistar rats were purchased from Harlan Laboratories, and for experiment 7, we used Sprague-Dawley rats generated at the animal care facility of the Multidisciplinary Institute of Cell Biology. Before experiments, animals were acclimatized for at least 5–10 days to a 12-hour light, 12-hour dark cycle (lights between 7 AM and 7 PM) in a room with controlled temperature ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity. Rat chow (Harlan 2018SX) and tap water were provided *ad libitum*.

Experimental protocols

In experiment 1, rats (400–450 g, age 120–130 d; $n = 5$ in each group) were isolated in individual cages for either 48 or 72 hours and allowed free access to food and water (control animals), or isolated and deprived of food for either 48 or 72 hours with water *ad libitum* (experimental animals). Between 9 and 11 AM, animals were overdosed with pentobarbital (50 mg/kg *ip*), blood withdrawn from aorta, and perfused transcardially with 20-mL 0.01M PBS (pH 7.4) containing 15 000-U/L heparin sulfate, followed by 150-mL 4% paraformaldehyde in PBS. The brains were rapidly removed and postfixed by immersion in the same fixative for 2 hours at room temperature. Brain tissue was cryo-protected in 25% sucrose in PBS at 4°C overnight, snap frozen on dry ice, and stored at -70°C . Because data were identical in control animals isolated for either 48 or 72 hours, data from both groups were pooled.

In experiment 2, rats, raised 2 per cage since weaning, were isolated 5 days before initiation of fasting. Animals (300–350 g, age 78 d; $n = 4$ in each group) were separated in 2 experimental groups, either maintained with free access to food and water, or deprived of food for 48 hours with water *ad libitum*. Between 9 and 12 AM, animals were overdosed with pentobarbital, blood withdrawn, and brain tissue prepared as described for experiment 1.

In experiments 3 and 4, rat weight was 250–300 g, ages 65 or 75 days for experiments 3 or 4, respectively; $n = 5$ in each group. Control animals were isolated for either 36, 48, 60, or 72 hours and allowed free access to food and water, whereas experimental animals were isolated and deprived of food for either 36, 48, 60, or 72 hours with water *ad libitum*. Finally, animals were euthanized by decapitation between 9 and 12 AM, brain, anterior pituitary and liver removed, and tissues frozen on dry ice; trunk blood was collected for hormone and metabolite dosage. A brain coronal slice (bregma -2.12 to -3.6 mm) (26) was used to dissect the ME with a sample corer (0.5-mm internal diameter; Fine Science Tools) centered between the base of the brain as the ventral limit and the floor of third ventricle as a dorsal limit. The same slice and sample corer were used to obtain parietal cortex (area 1) samples from the right and left hemispheres.

In experiment 5, between 9 and 12 AM rats (270–330 g, age 70 d; $n = 6$ in sham and 40% corticosterone/60% cholesterol group, and $n = 5$ for the adrenalectomized and 25% corticosterone/75% cholesterol groups) were either sham operated or bilaterally adrenalectomized under ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg anesthesia and implanted with a sc corticosterone pellet (27, 28). The pellets were made of either cholesterol, or 25% corticosterone/75% cholesterol, or 40% corticosterone/60% cholesterol (percentages of wt/wt). Animals were maintained 2 per cage with free access to food, and either water (sham) or 0.5% saline solution (adrenalectomized rats). Animals

were killed 3 days later, and tissue and blood were collected as described for experiments 3 and 4.

In experiment 6, rats (200–300 g, age 60–75 d) were separated in 5 groups: control (intact, $n = 3$), vehicle (200- μ L sterile saline/0.01N NaOH per 3 d beginning on d 19; $n = 1$), hypothyroid (0.1% methimazole + 1% sodium perchlorate in their drinking water per 21 d; $n = 2$), hypothyroid + vehicle (200 μ L per 3 d beginning on d 19; $n = 3$), and hypothyroid + T_4 (10 μ g in 200- μ L vehicle per 3 d beginning on d 19; $n = 3$). Rats were perfused transcardially 6 hours after the last injection and brain tissue prepared as described for experiment 1. Blood was collected from the aorta before infusion. Because of the small number of animals, data from control and vehicle groups were pooled; the same applied for hypothyroid and hypothyroid plus vehicle groups.

In experiment 7, rats (250–300 g, age 60–80 d; $n = 3$ in each group) were isolated and separated in 3 experimental groups. Rats were either maintained with free access to food and water or deprived of food for either 48 or 72 hours with water ad libitum. On the morning of the experimental day, animals were perfused with formalin as previously described (29). Brains were removed, postfixed, immersed in 20% sucrose.

In situ hybridization (ISH) and image analysis

Serial 18- μ m coronal sections through the rostrocaudal extent of the ME were cut on a cryostat (OTF model; BRIGHT Instruments Co Ltd), adhered to Superfrost/Plus slides (Fisher Scientific), desiccated overnight at 42°C, and stored at -80°C until prepared for ISH. Every fourth section of the ME (bregma -2.56 to -3.14 mm) was hybridized with either a 644-bp single stranded [³⁵S]-uridine-5'-triphosphate (UTP)-labeled RNA probe complementary to the coding region of the rat PPII gene (nucleotides 129–773) (17), or a 800-bp single stranded [³⁵S]-UTP-labeled cRNA probe complementary to the entire coding region of the rat deiodinase 2 (D2) gene (30). Sections at PVN level (mid and caudal, bregma -1.56 to -2.04 mm) were hybridized with a 1241-bp single stranded [³⁵S]-UTP-labeled cRNA probe complementary to the rat pro-TRH (31). Hybridization was performed as previously described (17). Slides were dipped into emulsion, and the autoradiograms developed after 4 days (pro-TRH), 11 days (D2), and 33 or 38 days (PPII) of exposure at 4°C.

Silver grains were visualized under dark field illumination with a $\times 5$ objective (Zeiss Axioscop microscope) and a charge coupled device Sony video camera. Positive areas were delineated, and integrated density values (density \times area) were measured in each section using Mercator Explora Nova imaging software. For each ISH trial, the sum of the integrated density values of up to 6 slices/animal was calculated and taken as 1 determination.

The anatomical distribution of hybridization data indicated that results were specific for the target mRNAs (Figure 1; see also figure 4 below). Pro-TRH mRNA signal was high in the PVN, in a distribution pattern consistent with published studies (32). In the MBH PPII mRNA was detected along the medial and ventral parts of the border of the third ventricle wall, within the ME and, with much lower concentration in the surrounding tissue, consistent with previous results (16, 17). D2 mRNA coincided with the distribution of tanycytes and was also detected in the substance and external layer of the ME (33).

Immunocytochemistry and image analysis

Twenty-five-micrometer coronal sections were used to perform pro-TRH staining (29). Briefly, brain sections were incubated overnight with an anti-pro-TRH antibody (1:3000). Rabbit anti-pro-TRH antibody was generated against C-terminal prepro-TRH_{239–255} sequence (KQSPQVEPWKPLEE) plus a tyrosine added at the N-terminal end (34). Sections were treated with a biotinylated donkey antirabbit antibody and with Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories). Visible signal was developed with a 3-3'-diaminobenzidine/nickel solution. Immunostaining of negative control, which did not show any antiserum immunolabeling, included sequential elimination of either the primary or secondary antibody from the staining procedure. Bright-field images were acquired with an Eclipse 50i microscope and a DS-Ri1 digital camera. The software program Adobe PhotoShop 7.0 was used to combine the photomicrographs into plates and adjust levels, contrast and brightness in the images. To determine the total number of pro-TRH-immunoreactive (IR) cells in the medial PVN, cells containing distinct black/purple precipitate were quantified in 1 out of 3 complete series of coronal brain sections. For analysis, the pro-TRH-IR cells of the PVN were subdivided into parvo- and magnocellular subregions (35) and estimated in the parvocellular subregion of the mid-level of the PVN ranging between bregma -1.60 and -1.88 mm. Data were corrected for double counting, according to the method of Abercrombie (36), and expressed as the number of pro-TRH-IR cells per coronal section. Blind quantitative analysis was performed independently by 2 observers.

Measurement of PPII, and thyroliberinase activities

PPII activity was determined as described (37). Membranes were collected by centrifugation. Protein concentration was determined by the Bradford assay. PPII and thyroliberinase activities were determined using TRH- β NA as substrate in a coupled assay with excess dipeptidyl aminopeptidase IV (EC 3.4.14.5) and inhibitors of pyroglutamyl peptidase I (EC 3.4.19.3), and of prolylendopeptidase (EC 3.4.21.26). Enzymatic assays were performed at 37°C under initial velocity conditions. In agreement with previous data (17), in control animals PPII specific activity was higher in the ME than in the anterior pituitary (experiment 3; control ME = 48.8 ± 2 pmol β NA/min-mg protein; control anterior pituitary = 10.9 ± 0.5 ; control parietal cortex = 80.4 ± 5.8). Differences between groups were significant ($n = 19$; $P < .0001$; ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test). Because expression and activity drastically diminish from the third ventricle wall to the brain parenchyma (17), the activity of ME PPII was not standardized per mg protein, but reported by structure, to minimize variation due to dissection.

Liver D1 activity

D1 activity was determined in liver microsomes (10 μ g of protein) with ¹²⁵I-rT₃ (PerkinElmer, NEX109) as a substrate (38); the labeled hormone was purified before use by chromatography on Sephadex LH 20. Released ¹²⁵I was separated by chromatography on Dowex 50WX2, 100–200 mesh, and quantified with a γ counter. Blank values (without homogenate) were subtracted; proteins were determined with the Bradford assay. Values were linear with time (between 5 and 15 minutes) and protein concentration (between 5 and 10 μ g of protein). Specific

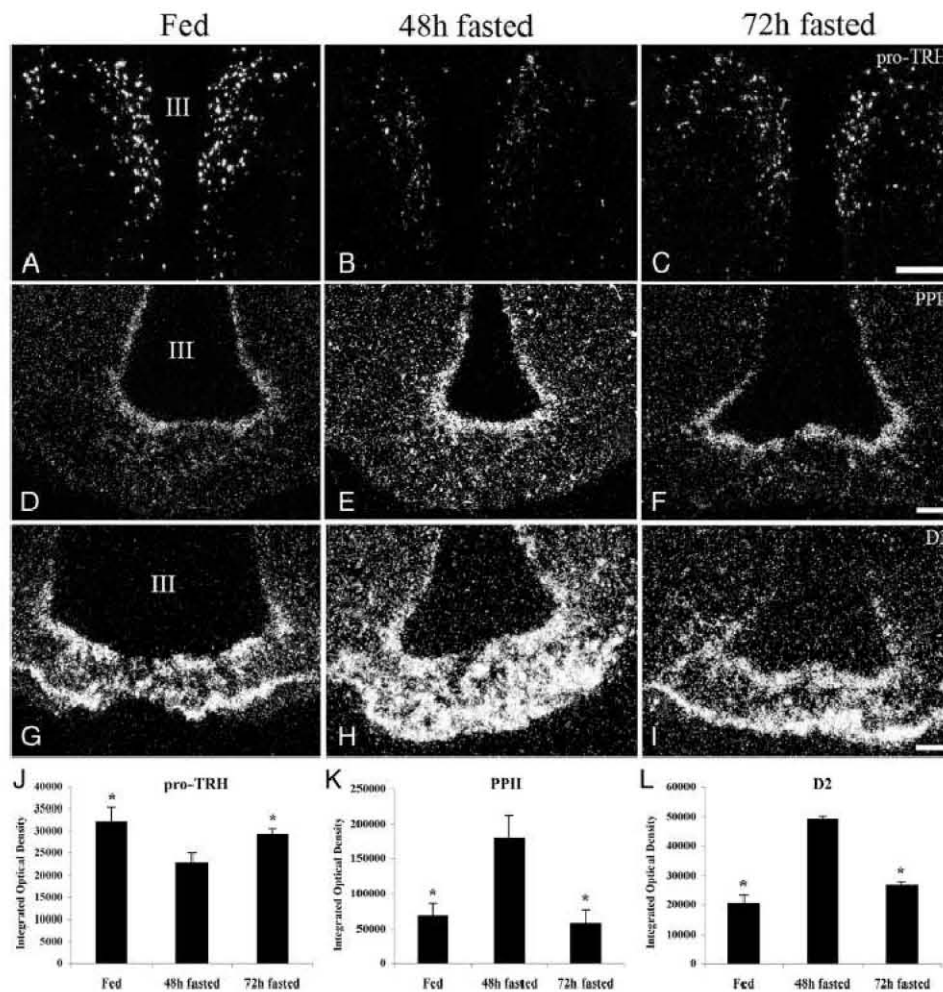


Figure 1. Effect of fasting on pro-TRH, D2, and PPII mRNA expression in MBH; experiment 1. mRNAs were detected by ISH with [³⁵S]-labeled cRNA probes; sections viewed at $\times 5$ under dark-field illumination. A–C, Photomicrographs of coronal slices through the medial PVN hybridized with a pro-TRH mRNA probe. D–E, Photomicrographs of coronal slices through the MBH hybridized with a PPII mRNA probe. G–I, Photomicrographs of coronal slices through the MBH hybridized with a D2 mRNA probe. A, D, G: control rats, fed ad libitum; B, E, H: rats submitted to 48 hours of fasting; C, F, I: rats submitted to 72 hours of fasting. J–L, The graphs show the densitometric analyses of the ISH autoradiograms. Data were analyzed by one-way ANOVA and post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Data are mean \pm SEM. Pro-TRH, $n = 3$ –5; D2, $n = 3$ –5; PPII, $n = 4$ –5. *, $P < .05$ compared to 48 hour fasted. III, third ventricle. Scale bar, 100 μ m.

activity values, and the effect of fasting on activity, were consistent with previous studies (11–13), suggesting that the assay primarily detected D1.

Measurements of hormone concentrations in serum

Serum TSH levels were analyzed by RIA using National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases reagents. Serum corticosterone levels were analyzed by RIA with reagents from Merck-Millipore, Perkin Elmer, and Sigma. In experiments 2, 3, and 5, total serum T₃ and T₄ concentrations were analyzed by ELISA (Diagnóstica Internacional). In experiment 4, total T₃ and T₄ concentrations were analyzed by RIA with RK-6CT1 and

RK-11CT1 kits (Siemens Diagnostic Products Corp), respectively. Serum leptin concentrations were measured with an ELISA kit (Crystal Chem, Inc).

Detection limits were: TSH, 25 ng/mL; T₄-RIA, 30 nmol/L; T₄-ELISA, 16 nmol/L; T₃-RIA or -ELISA, 0.3 nmol/L; corticosterone, 25 ng/mL; and leptin, 0.2 ng/mL. The intra-assay precision was $\leq 5\%$, $\leq 10\%$, and $\leq 4.3\%$, and the inter-assay precision was $\leq 9\%$, $\leq 10\%$, and $\leq 4.5\%$ for TSH, corticosterone, and leptin, respectively. The intra-assay precision was $< 6.8\%$ for T₄-RIA and $< 4.3\%$ for T₄-ELISA, $< 6.0\%$ for T₃-RIA and $< 9.6\%$ for T₃-ELISA. The inter-assay precision was $< 6.0\%$ for T₄-RIA and $< 4.5\%$ for T₄-ELISA, $< 10.6\%$ for T₃-RIA and $< 10.3\%$ for T₃-ELISA. Proteins were determined with the Bradford assay.

Table 1. Body Weight Gain and Serum Hormone Concentrations in Normally Fed Male Animals and 36–72 Hours of Fasting; Experiment 3

	Control 36 h	Fasting 36 h	Control 48 h	Fasting 48 h	Control 60 h	Fasting 60 h	Control 72 h	Fasting 72 h
Body weight gain ^a	13.2 ± 0.3 (5)	-26.4 ± 0.9 (5)***	6.6 ± 2.1 (5)	-32.2 ± 1.5 (5)***	7 ± 0.5 (5)	-25.2 ± 1.7 (5)***	8.8 ± 1.4 (5)	-20.6 ± 1 (5)***
TSH ^b	1.60 ± 0.1 (5)	1.16 ± 0.1 (4)	2.15 ± 0.2 (5)	1.49 ± 0.1 (5)	2.87 ± 0.5 (5)	1.32 ± 0.1 (5)*	3.31 ± 0.9 (5)	1.07 ± 0.7 (5)***
T ₃ (total) ^c	1.39 ± 0.16 (5)	0.90 ± 0.05 (4)*	1.45 ± 0.13 (5)	1.25 ± 0.11 (5)	1.40 ± 0.10 (5)	1.14 ± 0.15 (5)	1.34 ± 0.11 (5)	0.79 ± 0.09 (3)*
T ₄ (total) ^c	108 ± 9 (5)	62.6 ± 4.5 (5)***	106 ± 7.1 (5)	37 ± 4.7 (5)***	89.2 ± 11.5 (5)	44.4 ± 2.5 (5)***	77.9 ± 5.1 (5)	48.2 ± 11.6 (5)
Corticosterone ^b	101 ± 14.4 (5)	570 ± 124 (4)*	121 ± 20.9 (5)	253 ± 65 (5)	26.8 ± 4.2 (5)	587 ± 116 (5)***	34.2 ± 12.1 (5)	215 ± 75 (5)*
Serum proteins ^d	74.3 ± 6.5 (5)	68.8 ± 5.1 (5)	77.4 ± 2.3 (5)	66.1 ± 3.9 (5)	71.7 ± 3.4 (5)	74.4 ± 2.5 (5)	72.7 ± 3.0 (5)	69.7 ± 8.3 (5)

Post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparisons test: *, $P < .05$; ***, $P < .005$, compared with control. Data are mean ± SEM.

^a In g.

^b In ng/mL.

^c In nmol/L.

^d In $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Statistical analysis

Results are presented as means ± SEM. Statistical significance between control and experimental groups was determined by unpaired *t* test (experiment 2) or one- or two-way ANOVA, followed by Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. When data did not pass the normality test, they were reanalyzed after transformation to root square or logarithm base 10. Differences were considered significant at $P < .05$. ANOVA data are shown in Supplemental Table 1. Results of post hoc tests are shown in figures, tables, or text. For experiment 1, linear correlation analyses were performed with Sigma Plot software and considered significant when $P \leq .05$.

Results

Fasting increases PPII mRNA expression in the MBH, PPII activity in the ME, and thyroliberinase activity in serum

To determine whether PPII expression in tanycytes is regulated by fasting, we subjected male rats to either 48 or 72 hours of fasting (experiment 1). Serum TSH levels tended to be lower in fasted than in control animals (control: 2.2 ± 0.9 , fasting 48 h: 1.24 ± 0.14 , fasting 72 h: 0.9 ± 0.2 ng/mL; $n = 5$). PPII mRNA levels in the ME were increased 2.5-fold at 48 hours of fasting. This increase was transitory because PPII mRNA levels were similar to control values at 72 hours of fasting (Figure 1). The increase in PPII mRNA levels was even more intense, but equally reversed with time, if PPII mRNA expression was quantified in the ME together with the lateral ventricular walls (ie, the region where both β - and α -tanycytes are found) (data not shown). These data suggest that PPII expression was regulated by fasting both in α - and β -tanycytes.

Because animals were isolated concomitantly with fasting initiation, the results may have been dependent on the stress produced by isolation (39). Thus, male rats accustomed to isolation for 5 days were subjected to 48 hours of fasting in an independent experiment (experiment 2). Body weight gain dropped in fasted animals, and serum

TSH, T₄ and T₃ concentrations were lower in fasted than in control animals (Supplemental Table 2). PPII mRNA levels in the ME were increased 1.4-fold by 48 hours of fasting (Supplemental Figure 1); this result suggests that fasting regulates ME PPII mRNA levels independently of isolation. Therefore, the next experiments were done according to experiment 1 protocol.

Two other experiments were performed to determine the dynamics of fasting effects on PPII activity. In experiment 3, fasting decreased body weight gain as well as serum TSH, total T₃ and T₄ concentrations, and increased serum corticosterone levels; these effects were detected at 36 hours and/or at later time points (Table 1). In fed animals, the ME PPII activity tended to decrease when the time of isolation increased. Fasting enhanced ME PPII activity, with a significant increase at 72 hours of fasting (Figure 2A). Notably, parietal cortex or anterior pituitary PPII-specific activities were not affected by fasting (Figure 2, B and D). Finally, serum thyroliberinase activity in fasted animals was increased after 48 hours of fasting, and at later time points (Figure 2C).

In experiment 4, fasting decreased body weight gain, serum concentrations of leptin, TSH, and total T₄, as well as liver D1 activity, whereas it increased serum corticosterone concentration; these effects were detected at 36 hours of fasting and/or at later time points (Supplemental Table 3). In fed animals, the ME PPII activity tended to decrease, whereas the time of isolation increased. Fasting increased ME PPII activity between 48 and 72 hours, with significant effects at 48 and 72 hours (Supplemental Figure 2A). Fasting decreased parietal cortex PPII-specific activity after 72 hours of fasting (Supplemental Figure 2D). In the anterior pituitary, PPII-specific activity was not affected by fasting (Supplemental Figure 2B). Finally, serum thyroliberinase-specific activity was increased at 36 or more hours of fasting (Supplemental Figure 2C).

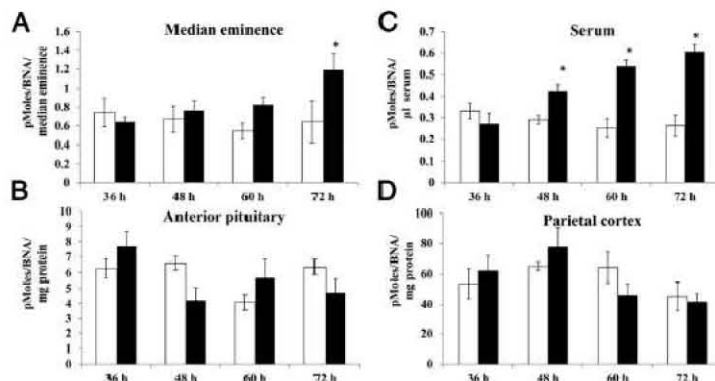


Figure 2. Effect of fasting on activity of PPII in ME, parietal cortex, anterior pituitary, and serum; experiment 3. The graphs show activity or specific activity of PPII in control animals and fasted animals between 36 and 72 hours. Fasting increased PPII activity in the ME (A). Fasting did not change specific activity of anterior pituitary or parietal cortex PPII (B and D). Fasting enhanced thyroliberinase activity (C). White bars, control; black bars, fasted. Values are picomoles product per minute per tissue (A), or per milligram of protein (B and D), or per microliter of serum (C). Data were analyzed by one-way ANOVA and post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Data are mean \pm SEM. $n = 5$ (A and B), $n = 4-5$ (C), $n = 4-5$ (D). *, $P < .05$.

Effect of adrenalectomy and corticosterone treatment on PPII activity in the ME and thyroliberinase activity in serum

Based on the relevance of adrenal status for HPT axis activity (40) and the differential changes in serum corticosterone concentration during isolation and fasting, we evaluated the effect of adrenalectomy and corticosterone treatment on PPII activity in ME and serum (experiment 5). In adrenalectomized animals, corticosterone levels

were undetectable; implantation of pellets with 25% or 40% corticosterone led to serum corticosterone values 3- or 4-fold higher than in sham animals (Figure 3A). Adrenalectomy decreased body weight gain and serum protein concentration and failed to affect the relative concentration of serum TSH (amount/mg protein). Corticosterone treatment did not reverse the decrease in body weight gain but did reverse the serum protein concentration change, and tended to decrease the relative concentration of serum TSH (mol/mg protein). The relative serum concentrations of total T_3 and T_4 were not affected by adrenalectomy and corticosterone treatments. The relative concentration of serum leptin tended to decrease with adrenalectomy; this effect was partially reverted with corticosterone treatment (Table 2). Adrenalectomy and corticosterone treatments did not change ME PPII activity, or the specific activity of thyroliberinase (Figure 3, B and C).

Thyroid status regulates PPII mRNA expression in the MBH

ISH histochemistry data indicated that ME D2 mRNA expression is enhanced after 48 hours of fasting; however, it returned to fed values at 72 hours of fasting (Figure 1). The ME PPII mRNA levels correlated positively with ME D2 mRNA levels (Supplemental Figure 3B). In experiment 6, we evaluated the sensitivity of PPII mRNA expression in the rat ME to thyroid status. Methimazole-induced hypothyroidism increased serum TSH level at day 21 after treatment; treatment with T_4 for 3 consecutive days beginning at day 19 after methimazole treatment reverted this serum TSH increase (control: 2.14 ± 0.5 ng/mL [2], methimazole: 18.4 ± 5.2 [4]*, methimazole + T_4 : 3.8 ± 0.3 [3]; *, $P < .05$ compared with control). ISH data show that hypothyroidism produced a drastic decrease in ME PPII mRNA levels; this drop was reversed if methimazole-treated animals were treated with T_4 for 3 consecutive days and killed 6 hours after the last injection (Figure 4, A-D).

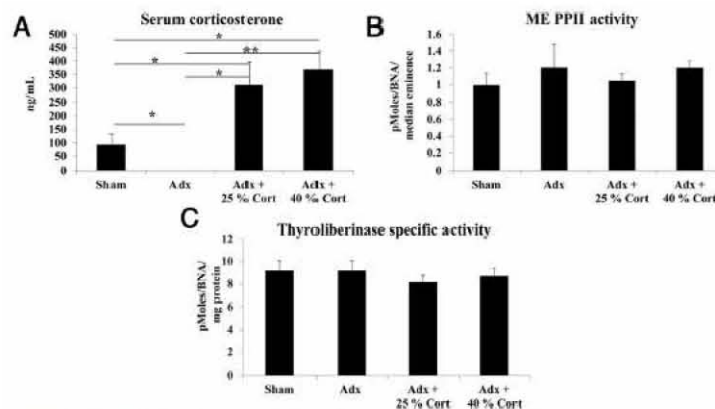


Figure 3. Effect of adrenalectomy (Adx) and corticosterone (Cort) replacement on ME PPII activity and thyroliberinase activity; experiment 5. The graphs show serum corticosterone concentrations and activity or specific activity of PPII in sham, adrenalectomized, and adrenalectomized animals implanted with 25% or 40% corticosterone pellets at 72 hours. Adrenalectomy decreased serum corticosterone concentration (A). Adrenalectomy and corticosterone implants did not change ME PPII-specific activity (B) or specific activity of thyroliberinase (C). Values are in ng/mL (A), pmol/min (B), or pmol/mg protein (C). Data were analyzed by one-way ANOVA and post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Data are mean \pm SEM. $n = 6$, except for adrenalectomy and adrenalectomy plus 25% corticosterone groups, $n = 5$. *, $P < .05$; **, $P < .01$.

Table 2. Serum Concentrations of TSH, Thyroid Hormones, and Leptin in Normally Fed Male Animals Adrenalectomized (Adx) and Treated With Corticosterone; Experiment 5

	Sham	Adx	Adx + 25% Cort	Adx + 40% Cort
Body weight gain ^a	-4.33 ± 3.09 (6)	-17.8 ± 4.23 (5)*	-21.4 ± 3.85 (5)*	-16.0 ± 3.52 (6)*
Serum protein ^b	47.9 ± 2.67 (6)	34.0 ± 3.92 (5)**	44.7 ± 3.3 (5) ^{&}	49.7 ± 2.1 (6) ^{&}
TSH ^c	35.2 ± 6.9 (6)	40.4 ± 9.1 (5)	22.6 ± 2.1 (5)	23.3 ± 2.9 (6)
Leptin ^c	141 ± 37.9 (6)	62.4 ± 21.7 (5)	119 ± 24.9 (5)	115 ± 28.1 (6)
T ₃ (total) ^d	12.3 ± 1.8 (6)	15.0 ± 1.46 (5)	11.8 ± 4.51 (5)	9.66 ± 0.95 (6)
T ₄ (total) ^d	1620 ± 400 (6)	2000 ± 400 (5)	1390 ± 164 (5)	1270 ± 52.1 (6)

Adx, adrenalectomized; Cort, corticosterone. Post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparisons test: *, $P < .05$; **, $P < .01$ compared with sham; &, $P < .05$ compared with adrenalectomy. Data are mean ± SEM.

^a In g.

^b In $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

^c In ng/mg protein.

^d In nmol/mg protein.

Prolonged fasting partially reinitiates pro-TRH expression in the PVN

Data from experiment 1 showed that 48 hours of fasting reduced pro-TRH mRNA levels in the medial and cau-

dal parts of the PVN; noticeably, pro-TRH mRNA levels at 72 hours of fasting were intermediary between those in fed and 48-hour-fasted animals (Figure 1). Pro-TRH mRNA values correlated negatively with ME D2 mRNA

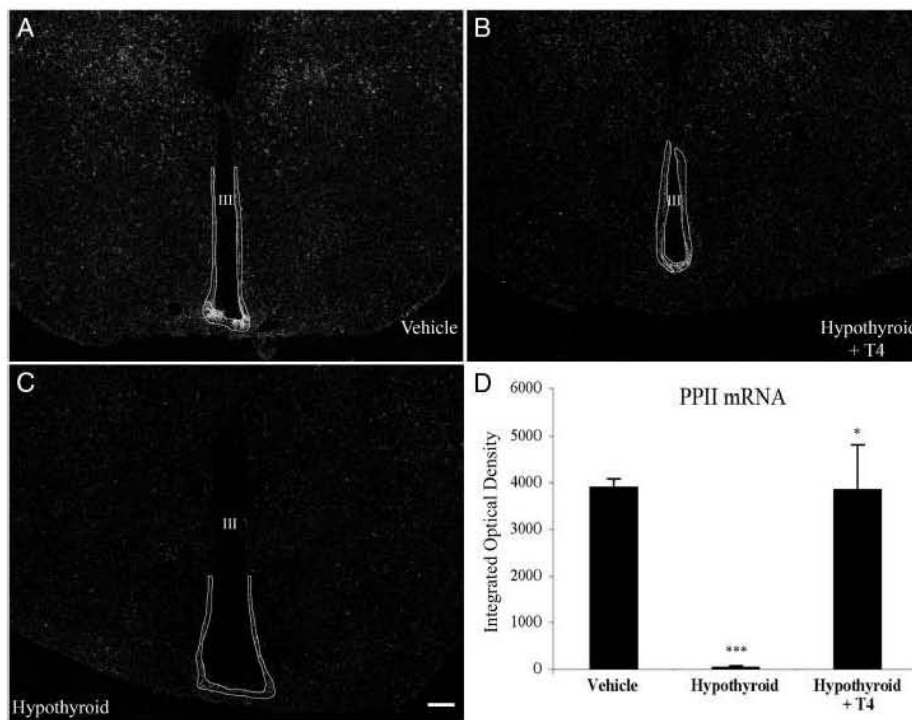


Figure 4. Effect of hypothyroidism and T₄ restitution on expression of PPII in MBH; experiment 6. PPII mRNA was detected by ISH with a [³⁵S]-labeled cRNA probe. A–C, Dark-field photomicrographs of coronal sections through the MBH (exposure time, 38 d); images are made by a collage of 16 images taken at ×5. Line drawings indicate the area that was quantified to generate densitometric data. A, Rat injected with vehicle (200 μL sterile saline/0.01N NaOH) per 3 days beginning on day 19. B, Rat made hypothyroid with 0.1% methimazole + 1% sodium perchlorate in drinking water treated with T₄ (10 μg in 200- μL vehicle per 3 d beginning on d 19). C, Rat made hypothyroid with 0.1% methimazole + 1% sodium perchlorate in drinking water during 21 days. D, The graph shows the densitometric analyses of ISH microradiograms (exposure time, 33 d); data in vehicle group include intact (n = 3) and vehicle (n = 2)-treated animals; data in hypothyroid group include data from hypothyroid (n = 2), and hypothyroid + vehicle (n = 3) rats; hypothyroid + T₄ (n = 3). Data were analyzed by one-way ANOVA and post hoc Student-Newman-Keuls multiple comparisons test. Data are mean ± SEM. *, $P < .05$ compared to hypothyroid; ***, $P < .001$, compared to vehicle. III, third ventricle. Scale bar, 100 μm .

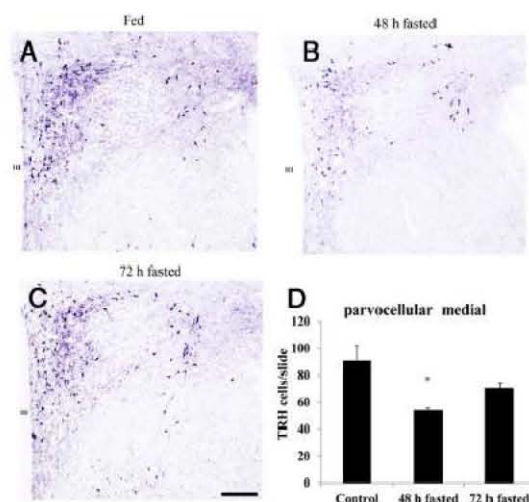


Figure 5. Effect of fasting on the number of TRH immunopositive neurons in the medial PVN in male rats; experiment 7. Coronal slices of the medial PVN immunolabeled with an antibody against pro-TRH: control (A), rats submitted to 48 hours of fasting (B), rats submitted to 72 hours of fasting (C), and quantification of pro-TRH immunoreactivity in the medial PVN (D). Data are mean \pm SEM, $n = 3$. *, $P < .05$. III, third ventricle. Scale bar, 100 μ m.

levels (Supplemental Figure 3A). To confirm that PVN pro-TRH expression spontaneously reverts if fasting occurs for more than 2 days, we quantified the number of pro-TRH cells positive in the parvocellular subregion of the medial level of the PVN in experiment 7. The number of pro-TRH positive cells in the medial parvocellular region of the PVN decreased at 48 hours of fasting and increased towards values found in fed animals at 72 hours of fasting (Figure 5).

Discussion

Multiple molecular changes in specific organs orchestrate an inhibition of HPT axis in response to fasting (1, 8). The data obtained in this study indicate that regulation of HPT axis activity in response to fasting includes an adjustment in ME PPII activity, the ectopeptidase that hydrolyzes TRH, in male rats. This change in activity is probably localized in tancycytes, including $\beta 2$ tancycytes, because PPII mRNA expression increased in cells that correspond to tancycytes localization. PPII is likely present on the surface of $\beta 2$ tancycytes and expected to affect HPT axis activity because in vitro PPII inhibition enhances the recovery of TRH released from the ME, and in vivo PPII inhibition augments serum TSH concentration in cold-stressed animals (17). Thus, we propose that a delayed increase of ME PPII activity during fasting contributes to

reduce TRH concentration in the portal blood (2), and therefore to down-regulate HPT axis activity. The enhancement of the extracellular hydrolysis of TRH may limit the possibility that a partial reactivation of TRH neurons reinitiates thyroid axis function when fasting is prolonged.

Prolonged fasting promotes a partial reactivation of pro-TRH expression in the parvocellular PVN and a reversion of D2 mRNA induction in the MBH

Responses to fasting are likely dependent on its severity (41), but the effect of fasting on the dynamics of D2 expression is poorly described. In male rats, D2 mRNA expression is enhanced after 72 hours of fasting in α - and β -tancycytes (42). D2 activity increases in the MBH after 48 hours of fasting (43). In our experimental conditions, ME D2 expression increased after 48 hours of fasting, but normalized to values found in fed animals after 72 hours of fasting. Known enhancers of D2 activity in MBH are the inverse changes in circulating levels of corticosterone and leptin (43), which may have led to the peak of expression we detected after 48 hours of fasting. The drop in D2 expression in tancycytes after 72 hours of fasting may be due to a reduction of serum corticosterone concentration, as animals habituated to the stress.

As for D2 expression, the effect of fasting on the dynamics of PVN pro-TRH mRNA expression and TRH release in male rats is poorly defined; PVN pro-TRH mRNA levels are lower after 48–65 hours of fasting as compared with values detected in fed animals (2–4, 44). We noticed a late and partial reversal of the fasting-induced reduction in PVN pro-TRH mRNA expression. This partial inversion was confirmed in an independent experiment in which we measured the number of cells immunoreactive for pro-TRH in the parvocellular part of the medial PVN. Immunohistochemical data were consistent with ISH results, showing a reactivation of pro-TRH translation during late fasting. ISH and immunohistochemical data were consistent in 2 different strains (Wistar in experiment 1 and Sprague-Dawley in experiment 7), despite strain differences in serum thyroid hormones and corticosterone concentrations (45).

During fasting, the decrease of serum leptin concentration reduces PVN pro-TRH mRNA levels and TRH release (3, 6). An increase of T_3 production in tancycytes may be a necessary link for down-regulation of PVN pro-TRH mRNA levels (4), but data in D2 or thyroid hormone receptor $\beta 2$ knock out mice do not support this hypothesis (10, 46–48). As for D2 expression, a reduction in serum corticosterone concentration may drive the reactivation of pro-TRH synthesis, because on a time scale of days, glucocorticoids inhibit TRH mRNA levels in the PVN (40).

The partial reactivation of pro-TRH expression in the PVN during late fasting coincides with an up-regulation of PPII activity in the ME

An increase in PPII mRNA levels in the ME as well as in the medial and ventral parts of the ventricle walls, presumably in tanycytes, was detected at 48 hours of fasting, the earliest time point analyzed by ISH. This increase in PPII expression was apparently independent of tanycyte subtypes and reproduced in an independent experiment with younger animals previously habituated to isolation. Thus, enhanced expression of MBH PPII at 48 hours of fasting is a consistent response, independent of adult animal age (in the 2–4.5 mo range) or housing conditions. The increase in tanycyte PPII expression was transient, because it was not detected after 72 hours of fasting. ME PPII activity was not affected by 36 hours of fasting but increased either after 48 hours of fasting in 1 experiment, or after 72 hours of fasting in another experiment. Thus, an increase in ME PPII expression in response to fasting produces a concomitant or delayed increase in ME PPII activity.

TRH hydrolysis by PPII produces His-Pro-NH₂, that may be either hydrolyzed by dipeptidyl peptidase IV (49), an enzyme abundant on the surface of many cell types (50), or spontaneously cyclize to cyclo His-Pro (49). Cyclo His-Pro is detected in the brain, including the hypothalamus; it may not be uniquely derived from TRH (51, 52). However, it is relevant to note that cyclo His-Pro concentration increases in the hypothalamus of fasted animals; the mechanism leading to its accumulation has not been clarified (51); it may be related to increased PPII activity in the ME.

Together, these results suggest that during prolonged fasting the catabolism of TRH by PPII is increased in the ME extracellular fluid, concomitant with positive adjustments in TRH expression in PVN neurons, which, if unbalanced, might partially reactivate TRH secretion in the portal capillaries. The control of ME PPII activity may thus contribute to maintain the reduction in the portal concentration of TRH that is detected in rats subjected to fasting (2, 53).

Putative drivers of up-regulation of PPII activity in the ME during fasting

Up-regulation of PPII activity in ME during fasting suggests that the activity is coordinated with other aspects of HPT axis function. The hypothesis that adrenal status, which is relevant for HPT axis activity (40), regulates ME PPII activity in fed animals was not supported by our data. Thus, it seems unlikely that the effect of fasting on ME PPII activity is mediated by changes in serum corticosterone concentration per se. It is, however, possible that the early inverse changes in serum corticosterone and leptin con-

centrations that increase D2 activity in the MBH during fasting (43) led together to an increase in MBH PPII expression. An effect of thyroid hormones on ME PPII expression and activity during fasting is consistent with available data. Fasting increases not only D2 expression and activity in ME (42, 43 and this study) but also hypothalamic T₃ levels (4). Thyroid hormones up-regulate PPII expression in all subtypes of tanycytes in the context of thyrotoxicosis (17), or in hypothyroid mice, with changes faster than those operating on pro-TRH synthesis in the PVN (19); finally, tanycyte PPII expression is exquisitely sensitive to thyroid status (this study). Thyroid hormones positively regulated PPII expression in tanycytes and MBH regions from bregma –2.56 to –3.14 mm (Figure 4), whereas brain PPII activity sensitivity to thyroid status is poor (20, 25). Thus, the opposite effects of fasting on PPII activity in the cortex and ME coincide with region-specific effects of thyroid hormones on PPII activity.

Fasting promotes an increase in the activity of thyroliberinase in serum

Thyroliberinase was the first TRH hydrolyzing activity biochemically characterized. Thyroliberinase activity increased during fasting, with significant changes detected relatively early (after 36 or 48 hours fasting) and maintained at least up to 72 hours of fasting. Because thyroid hormones up-regulate thyroliberinase activity (24, 25), the fasting-induced increase of thyroliberinase was unexpected. Additionally, thyroliberinase activity was insensitive to manipulation of serum corticosterone levels in fed animals. The mechanisms leading to enhanced thyroliberinase activity during fasting remain unknown. The increase in thyroliberinase activity detected in peripheral blood presumably coincides with an increase of the activity of this enzyme in the hypothalamus-pituitary portal blood vessels and may contribute to reduce the concentration of TRH reaching the thyrotrophs during fasting.

Relevance of anterior pituitary PPII activity

Because anterior pituitary PPII activity is sensitive to thyroid status and rapidly up-regulated by thyroid hormones in vivo, it was initially proposed that PPII contributes to the negative feedback that thyroid hormones exert on the HPT axis (20, 25). However, PPII is not expressed by thyrotrophs and does not control thyrotropin secretion in response to TRH in cell culture (21, 22), suggesting that PPII unlikely controls TSH secretion in this locus. We observed that fasting does not modify PPII activity in the anterior pituitary. Likewise, 7 days of food restriction in adult female rats does not change the expression of PPII in the anterior pituitary (54). It should be, however, noted that 48 hours of fasting decreases anterior pituitary PPII

activity in 28-day-old, but not in 3-month-old, male rats (55); the reason for this age-dependent response is unknown. Thus, in adult animals anterior pituitary PPII activity is not regulated by fasting and may not contribute to the adjustments of the HPT axis activity.

In conclusion, the initial drop of PVN pro-TRH expression in adult male rats that is induced by fasting is partially reversed between 48 and 72 hours after fasting initiation, when ME PPII as well as thyroliberinase activities are up-regulated. The adjustments of ME PPII and thyroliberinase activities may oppose the partial reactivation of TRH secretion and contribute to the reduced HPT axis activity that characterizes prolonged fasting. These data reveal unsuspected fluctuations in the dynamics of HPT axis during fasting, and are consistent with the evidence that tanyocytes respond to changes in energy balance (10).

Acknowledgments

We thank Dr E. Nillni (Brown University) for kindly providing the anti-pro-TRH antibody as well as the technical help of QFB M. Cisneros, MVZ E. Mata, G. Cabeza (Universidad Nacional Autónoma de México).

Address all correspondence and requests for reprints to: Jean-Louis Charli, DSc, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México. E-mail: charli@ibt.unam.mx; or Edith Sánchez-Jaramillo, DSc, Dirección de Investigaciones en Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, México D.F. 14370, México. E-mail: esanchez@imp.edu.mx.

This work was supported in part by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico) Grants 107109 (to E.S.-J.) and 154931 (to J.-L.C.), Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México Grant IN206712 (to J.-L.C.), International Brain Research Organization-Latin America Regional Committee Grant PROLAB 2014 (to E.S.-J. and M.P.), and the National Agency of Scientific and Technological Promotion of Argentina Grants PICT2010-1954 and PICT2011-2142 (to M.P.). MC L.L., a fellow of the Postgraduate Program in Biological Sciences (Universidad Nacional Autónoma de México), was supported by a fellowship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Mexico).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Sainsbury A, Zhang L. Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obesity Rev*. 2012;13:234–257.
- Blake NG, Eckland DJ, Foster OJ, Lightman SL. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology*. 1991;129:2714–2718.
- Légrádi G, Emerson CH, Ahima RS, Flier JS, Lechan RM. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. 1997;138:2569–2576.
- Coppola A, Hughes J, Esposito E, Schiavo L, Meli R, Diano S. Suppression of hypothalamic deiodinase type II activity blunts TRH mRNA decline during fasting. *FEBS Lett*. 2005;579:4654–4658.
- Sanchez VC, Goldstein J, Stuart RC, et al. Regulation of hypothalamic prohormone convertases 1 and 2 and effects on processing of thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Invest*. 2004;114:357–369.
- Perello M, Friedman T, Paez-Espinosa V, Shen X, Stuart RC, Nillni EA. Thyroid hormones selectively regulate the posttranslational processing of prothyrotropin-releasing hormone in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Endocrinology*. 2006;147:2705–2716.
- Perello M, Nillni EA. The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front Biosci*. 2007;12:3554–3565.
- Boelen A, Wiersinga WM, Fliers E. Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid*. 2008;18:123–129.
- Costa-e-Sousa RH, Hollenberg AN. Minireview: the neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*. 2012;153:4128–4135.
- Fekete C, Lechan R. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev*. 2014;35:159–194.
- Aceves C, Escobar C, Rojas-Huidobro R, et al. Liver 5'-deiodinase activity is modified in rats under restricted feeding schedules: evidence for post-translational regulation. *J Endocrinol*. 2003;179:91–96.
- O'Mara BA, Dittrich W, Lauterio TJ, St Germain DL. Pretranslational regulation of type I 5'-deiodinase by thyroid hormones and in fasted and diabetic rats. *Endocrinology*. 1993;133:1715–1723.
- Gavin LA, Bui F, McMahon F, Cavalieri RR. Sequential deiodination of thyroxine to 3,3'-diiodothyronine via 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodothyronine in rat liver homogenate. The effects of fasting versus glucose feeding. *J Biol Chem*. 1980;255:49–54.
- Vella KR, Ramadoss P, Lam FS, et al. NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways. *Cell Metab*. 2011;14:780–790.
- Charli JL, Vargas MA, Cisneros M, et al. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology*. 1998;6:45–57.
- Heuer H, Schäfer MK, O'Donnell D, Walker P, Bauer K. Expression of thyrotropin-releasing hormone receptor 2 (TRH-R2) in the central nervous system of rats. *J Comp Neurol*. 2000;428:319–336.
- Sánchez E, Vargas MA, Singru PS, et al. Tanyocyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 2009;150:2283–2291.
- Rodríguez EM, Blázquez JL, Pastor FE, et al. Hypothalamic tanyocytes: a key component of brain-endocrine interaction. *Int Rev Cytol*. 2005;247:89–164.
- Marsili A, Sanchez E, Singru P, et al. Thyroxine-induced expression of pyroglutamyl peptidase II and inhibition of TSH release precedes suppression of TRH mRNA and requires type 2 deiodinase. *J Endocrinol*. 2011;211:73–78.
- Bauer K. Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature*. 1987;330:375–377.
- Cruz R, Vargas MA, Uribe RM, et al. Anterior pituitary pyroglu-

- tamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*. 2008;29:1953–1964.
22. Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Deneff C. Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology*. 1990;127:1224–1233.
 23. Schmitzmeier S, Thole H, Bader A, Bauer K. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *Eur J Biochem*. 2002;269:1278–1286.
 24. White N, Jeffcoate SL, Griffiths EC, Hooper KC. Effect of thyroid status on the thyrotropin-releasing hormone-degrading activity of rat serum. *J Endocrinol*. 1976;71:13–19.
 25. Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P. Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology*. 1988;48:211–213.
 26. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd ed. New York, NY: Academic Press; 1986.
 27. Pompei P, Rifina F, McEwen BS. Effect of adrenal steroids on pre-neurokinin-A gene expression in discrete regions of the rat brain. *Mol Brain Res*. 1995;33:209–216.
 28. Akana SF, Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF. Corticosterone: narrow range required for normal body and thymus weight and ACTH. *Am J Physiol*. 1985;249:R527–R532.
 29. Cabral A, Valdivia S, Reynaldo M, Cyr NE, Nillni EA, Perello M. Short-term cold exposure activates TRH neurons exclusively in the hypothalamic paraventricular nucleus and raphe pallidus. *Neurosci Lett*. 2012;518:86–91.
 30. Sánchez E, Singru PS, Wittmann G, et al. Contribution of TNF- α and nuclear factor- κ B signaling to type 2 iodothyronine deiodinase activation in the mediobasal hypothalamus after lipopolysaccharide administration. *Endocrinology*. 2010;151:3827–3835.
 31. Fekete C, Singru PS, Sanchez E, et al. Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology*. 2006;147:520–529.
 32. Segerson TP, Hoefler H, Childers H, et al. Localization of thyrotropin-releasing hormone prohormone messenger ribonucleic acid in rat brain in situ hybridization. *Endocrinology*. 1987;121:98–107.
 33. Tu HM, Kim SW, Salvatore D, et al. Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology*. 1997;138:3359–3368.
 34. Perello M, Stuart R, Nillni EA. Prothyrotropin-releasing hormone targets its processing products to different vesicles of the secretory pathway. *J Biol Chem*. 2008;283:19936–19947.
 35. Merchenthaler I, Liposits Z. Mapping of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neuronal systems of rat forebrain projecting to the median eminence and the OVLT. Immunocytochemistry combined with retrograde labeling at the light and electron microscopic levels. *Acta Biol Hung*. 1994;45:361–374.
 36. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec*. 1946;94:239–247.
 37. Chávez-Gutiérrez L, Matta-Camacho E, Osuna J, et al. Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II. Insights into omega-versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *J Biol Chem*. 2006;281:18581–18590.
 38. Pazos-Moura CC, Moura EG, Dorris ML, et al. Effect of iodine deficiency and cold exposure on thyroxine 5'-deiodinase activity in various rat tissues. *Am J Physiol*. 1991;260:E175–E182.
 39. Grissom N, Bhatnagar S. Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem*. 2009;92:215–224.
 40. Kakuska I, Qi Y, Lechan RM. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 1995;136:2795–2802.
 41. Luque RM, Park S, Kineman RD. Severity of the catabolic condition differentially modulates hypothalamic expression of growth hormone-releasing hormone in the fasted mouse: potential role of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. 2007;148:300–309.
 42. Diano S, Naftolin F, Goglia F, Horvath TL. Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. 1998;139:2879–2884.
 43. Coppola A, Meli R, Diano S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology*. 2005;146:2827–2833.
 44. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. 1998;68:89–97.
 45. Kühn ER, Bellon K, Huybrechts L, Heyns W. Endocrine differences between the Wistar and Sprague-Dawley laboratory rat: influence of cold adaptation. *Horm Metab Res*. 1983;15:491–498.
 46. Coppola A, Liu ZW, Andrews ZB, et al. A central thermogenic-like mechanism in feeding regulation: an interplay between arcuate nucleus T3 and UCP2. *Cell Metab*. 2007;5:21–33.
 47. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor β 2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *J Clin Invest*. 2001;107:1017–1023.
 48. Galton VA, de Waard E, Parlow AF, St Germain DL, Hernandez A. Life without the iodothyronine deiodinases. *Endocrinology*. 2014;155:4081–4087.
 49. O'Connor B, O'Cuinn G. Post-proline dipeptidyl-aminopeptidase from synaptosomal membranes of guinea-pig brain. A possible role for this activity in the hydrolysis of His-ProNH₂, arising from the action of synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase on thyroliberin. *Eur J Biochem*. 1986;154:329–335.
 50. Misumi Y, Hayashi Y, Arakawa F, Ikehara Y. Molecular cloning and sequence analysis of human dipeptidyl peptidase IV, a serine proteinase on the cell surface. *Biochim Biophys Acta*. 1992;1131:333–336.
 51. Prasad C, Iriuchijima T, Edwards RM, Wilber JF, Mori M, Rogers DJ. On the mechanism of fasting-associated elevations in hypothalamic cyclo(His-Pro) content. *Neurochem Res*. 1986;11:339–347.
 52. Yamada M, Shibusawa N, Hashida T, et al. Abundance of cyclo(His-Pro)-like immunoreactivity in the brain of TRH-deficient mice. *Endocrinology*. 1999;140:538–541.
 53. van Haasteren GA, Linkels E, van Toor H, et al. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol*. 1996;150:169–178.
 54. Jaimes-Hoy L, Joseph-Bravo P, de Gortari P. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Horm Behav*. 2008;53:366–377.
 55. de Gortari P, González-Alzati ME, Cisneros M, Joseph-Bravo P. Effect of fasting on the content of thyrotropin releasing hormone and its mRNA in the central nervous system and pyroglutamyl peptidase II activity in the anterior pituitary of post-weaned and adult rats. *Nut Neurosci*. 2000;3:255–265.

8.- Discusión

La correcta regulación del eje tiroideo permite mantener la concentración constante de hormonas tiroideas en la circulación. Si por alguna razón la concentración de estas hormonas disminuye a largo plazo se pueden producir enfermedades asociadas al hipotiroidismo teniendo efectos negativos en el organismo, incluyendo la muerte (Mebis y Van den Berghe 2011). En condiciones de hipotiroidismo, se ha encontrado que las concentraciones locales de hormonas tiroideas no cambian en los tejidos y de esta manera se puede mantener las funciones básicas dependientes de estas hormonas, a pesar de su disminución en la circulación (Fekete y Lechan et al., 2014). En el caso de que el decremento de hormonas tiroideas se deba a la carencia de alimentos, cuando las reservas energéticas se encuentran bajas, la disminución de hormonas tiroideas se ha propuesto como un mecanismo adaptativo que reduce los efectos que estas tienen sobre el metabolismo en diferentes tejidos del cuerpo y así disminuir el gasto energético. Para lograr esto, el organismo tiene adaptaciones en diferentes tejidos y células que participan en la regulación del eje tiroideo. El ayuno es un modelo experimental muy bien documentado que disminuye la actividad del eje tiroideo y se ha demostrado la regulación de eventos fisiológicos clave del eje tiroideo como la TSH, las hormonas tiroideas y las enzimas desiodasas. Entre las más estudiadas está la disminución de la síntesis de TRH en el NPV mediada por la caída de leptina en la circulación. Dicha caída disminuye la síntesis y secreción de TSH y estas a su vez disminuyen la síntesis y secreción de hormonas tiroideas. Recientemente nuestro grupo de investigación encontró que la enzima que degrada a TRH, la PPII, se expresa en los tanicitos de la eminencia media, sitio de liberación de la TRH y que la inhibición de esta enzima aumenta el efecto exógeno de TRH sobre la secreción de TSH y el efecto endógeno de TRH sobre la secreción de TSH en respuesta al frío (Sánchez et al., 2009). Este trabajo, cuyo primer objetivo era determinar el efecto del ayuno sobre la expresión y actividad de PPII, muestra por primera vez, la relevancia de la enzima PPII en la eminencia media, ya que el RNAm y la actividad de la enzima aumenta su expresión tras un periodo de ayuno y proponemos que este aumento ayuda a mantener inhibido el eje tiroideo a través de disminuir la concentración en la circulación portal de la TRH y reducir su efecto sobre los tirotrópos, lugar donde induce la síntesis y secreción de TSH. Esta hipótesis está basada en que el eje tiroideo regula varios

de sus elementos moleculares para mantener una profunda inhibición durante un ayuno, la localización de la enzima en los tanicitos de la eminencia media y su regulación por hormonas tiroideas, por lo tanto, esta enzima es capaz de regularse en esta región y no es solo una enzima que se exprese de manera constitutiva, indicando un papel fisiológico. Por otro lado, aprovechamos estos experimentos para medir la actividad de la enzima en compartimentos relacionados con el eje tiroideo, en la pituitaria anterior y en el suero, ya que la isoforma que se expresa y se libera en el hígado y que es liberada a la circulación, la tiroliberinasa, pudiera participar en la degradación de la TRH durante su transporte de la eminencia media a la pituitaria anterior. Por un lado, no encontramos cambios en la actividad de la PPII de adenohipófisis, a pesar de la disminución de hormonas tiroideas en la circulación. Por otro lado, la enzima tiroliberinasa muestra cambios tempranos en relación con los cambios en la actividad de la eminencia media, este dato es novedoso, ya que tampoco se había analizado la respuesta de esta enzima al ayuno, sugiriendo que también juega un papel en la respuesta del eje tiroideo al ayuno. De esta manera, la PPII de la eminencia media y la actividad de la tiroliberinasa, pudieran actuar en conjunto para la completa inhibición del eje tiroideo.

Como segundo objetivo, intentamos dilucidar cuales son los mecanismos que promueven el aumento de actividad de PPII en el ayuno en la eminencia media y en el suero. Ya que la corticosterona ha mostrado regular varios elementos del eje tiroideo, realizamos adrenalectomía y restitución con corticosterona a las ratas para determinar si esta enzima es sensible a los cambios en corticosterona circulante. Ni la adrenalectomía ni la restitución con altas concentraciones de corticosterona tuvieron efecto sobre la PPII de la eminencia media ni sobre la tiroliberinasa, aunque quizá durante el ayuno, el aumento de corticosterona pudiera actuar junto con otros cambios moleculares (por ejemplo, la bajada de leptina, el aumento de ghrelina) para permitir el aumento de la PPII. Se ha demostrado que algunas moléculas son reguladas de manera permisiva por dos factores, por ejemplo, el aumento de la enzima D2 en el hipotálamo mediobasal durante el ayuno se debe al aumento en la corticosterona circulante en conjunto con la caída de leptina circulante, si se evita que alguno de estos eventos ocurra, la enzima D2 no aumenta en el ayuno (Coppola et al. 2005). Para probar que la PPII es regulada de manera permisiva otros experimentos deberán

realizarse en un futuro. No obstante, esto sugiere que la corticosterona por sí sola, a diferencia de otros elementos del eje tiroideo, no tiene efectos sobre la actividad de esta enzima. Por otro lado, en un experimento realizado durante la escritura de este trabajo en donde implantamos bombas osmóticas conteniendo leptina a animales sometidos a ayuno (para revertir la caída de leptina), no evitó que la actividad de PPII aumentara en la eminencia media ni en el suero. Ya que la administración exógena de leptina en animales sometidos a ayuno no elevó los valores de leptina a los animales control, es posible que esto explique la ausencia de los cambios que esperábamos en la actividad de PPII de los tanicitos y de la tiroliberina (ver apéndice, sección 10.1). Por lo tanto, un experimento adicional en donde la administración exógena de leptina nos permita elevar los valores de leptina circulante a niveles control debe realizarse. Es probable que otras moléculas puedan ser las responsables de este incremento en la actividad. Aunque se ha postulado que un aumento en la actividad de D2 promueve un aumento en la concentración local de T3 durante el ayuno, esto ha sido reabierto a debate (Lechan y fekete., 2014). Aunque el estado tiroideo ha mostrado regular a la enzima PPII en la eminencia media, si es que existe un aumento de T3 local en el hipotálamo, este podría ser un mecanismo que promueva el aumento de la expresión y actividad de PPII durante el ayuno. No obstante, existen dos publicaciones en donde el aumento del RNAm y la actividad de la desiodasa 2 inducido por una restricción alimentaria o por el ejercicio (Alvarez-Salas et al., 2014, Uribe et al., 2014) no correlaciona con un aumento de la actividad de PPII. Esto sugiere que, para promover cambios en la actividad de PPII se requiere un balance energético negativo fuerte, ya que a pesar de que la restricción alimentaria y el ejercicio son considerados modelos de balance energético negativo, no son tan profundos como la completa privación de alimento. Esto pudiera deberse en que el aumento de concentraciones locales de T3 solo afecte a las células que expresan a alguno de los transportadores de hormonas tiroideas, es probable que los tanicitos que expresan PPII no expresen al transportador en estas condiciones y no pueden ser reguladas por el aumento de T3 local producido por las células que expresan a PPII. Para dilucidar esto, se podría estudiar la colocalización de la D2, PPII y los transportadores de hormonas tiroideas en diferentes eventos fisiológicos. Por lo tanto, el aumento en el RNAm de la D2 en nuestros experimentos deja abierta la posibilidad de no ser la responsable del aumento de actividad de PPII durante el ayuno. Para ello, un

experimento de ayuno con la inhibición específica de la D2 de tanicitos podría definirnos su papel en la regulación de la PPII en esta condición. Por otro lado, la tiroliberinas también ha mostrado ser regulada positivamente por hormonas tiroideas y negativamente en condiciones de hipotiroidismo, esto significa que en el ayuno hay una discrepancia en cuanto a su regulación ya que las hormonas tiroideas se encuentran disminuidas en la circulación en esta condición. Por lo tanto, en el ayuno, el aumento de la actividad de tiroliberinas en el suero pudiera ser regulada por otros factores distintos a las hormonas tiroideas y que aún no se han identificado. No obstante, es probable que las hormonas tiroideas que sean las responsables de los cambios (PPII en eminencia media y tiroliberinas) y de los no cambios (pituitaria anterior y corteza parietal). La actividad de PPII de la pituitaria anterior y de la corteza parietal no mostró incrementos en este modelo experimental, sugiriendo que los cambios en la actividad son tejido específico y que el aumento de actividad no es un efecto inespecífico del ayuno en otras regiones del cerebro donde esta enzima se expresa. Por un lado, es probable que las células de la adenohipófisis y de la corteza parietal no tengan el receptor del factor y/o la maquinaria que permite el aumento de expresión y actividad de PPII en la eminencia media y en el hígado en el ayuno. A pesar de que se ha demostrado que la PPII de la pituitaria anterior es sensible a hormonas tiroideas hay una discrepancia en nuestros experimentos, ya que el decremento de hormonas tiroideas no afectó la actividad de la pituitaria anterior. Esta discrepancia puede deberse a que el decremento de hormonas tiroideas en la circulación durante el ayuno no afecta la concentración local que hay en la pituitaria y en la corteza parietal y por lo tanto, la actividad de estas enzimas no se ven afectadas. Recientemente se demostró que en el ayuno, no hay cambios en la concentración local de T3 en la pituitaria anterior, a pesar del decremento de hormonas tiroideas en la circulación, y en otros casos, la concentración local de T3 aumenta en órganos como el hígado, músculo y riñón (Galton et al., 2014). En la corteza, se ha encontrado que a pesar del hipertiroidismo o hipotiroidismo, las concentraciones locales de T3 se mantienen constantes. Por lo tanto, es probable que en estos tejidos los genes dependientes de hormonas tiroideas no se vean afectados tras este mecanismo homeostático de mantener constantes las concentraciones locales de hormonas tiroideas. Como se mencionó, Galton y colaboradores encontraron un aumento en la concentración local de T3 en el hígado durante el ayuno, y este aumento local podría

explicar el aumento en la expresión del RNAm de la PPII en el hígado (ver apéndice, sección 10.2) y el aumento en su producto proteico, la tiroliberinasa). Por lo tanto, las hormonas tiroideas pudieran ser los reguladores de la PPII de hígado (y posiblemente de la eminencia media) durante el ayuno. Por lo tanto, en el ayuno, se disminuye la expresión de TRH en el NPV por reguladores, pero además, la hidrólisis de la TRH por la PPII de tunicitos y la tiroliberinasa permita la inhibición profunda del eje tiroideo, aunque los reguladores de la PPII y la tiroliberinasa aún no han sido dilucidados (Figura 7).

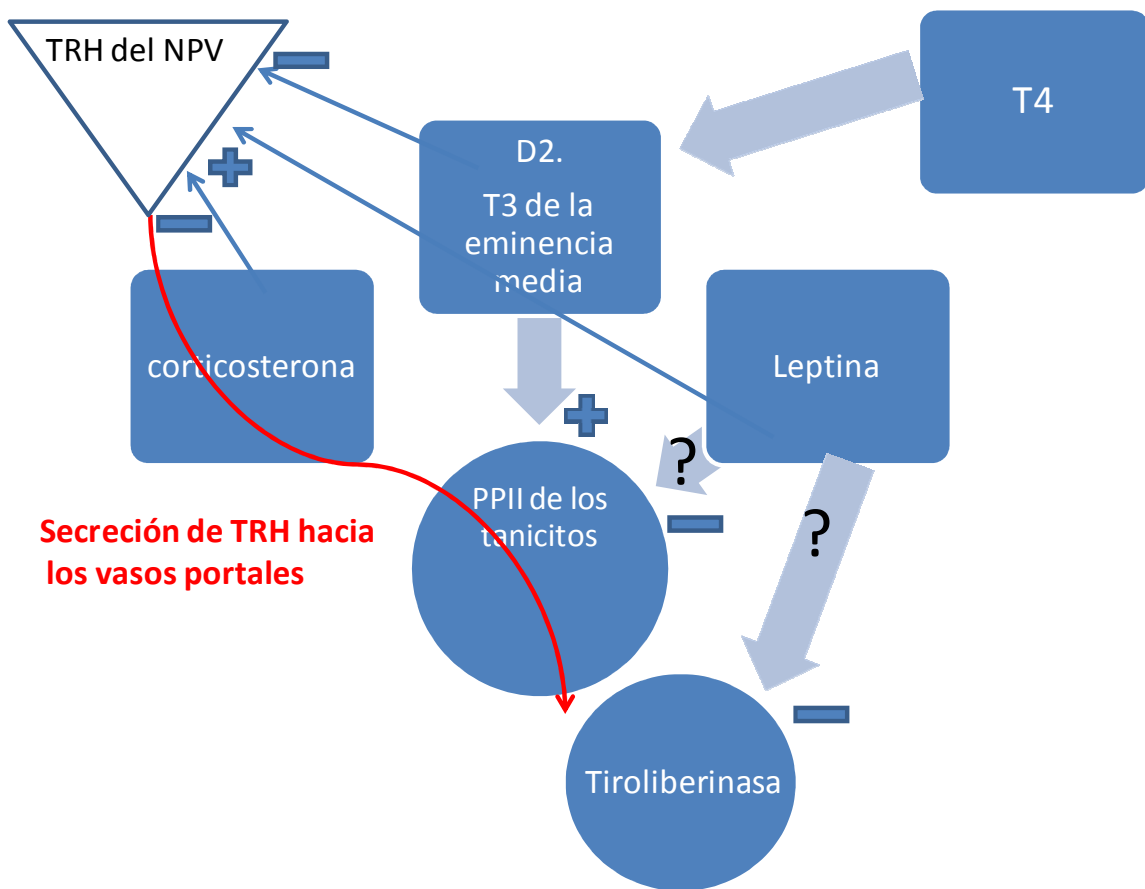


Figura 7. Control de la TRH y de la PPII de los tunicitos durante un ayuno. El ayuno promueve la inhibición del eje tiroideo mediante la reducción de la síntesis de la TRH en el NPV por el aumento de corticosterona circulante, disminución de leptina circulante y el aumento de la T3 local en la eminencia media. Adicionalmente, el aumento en la hidrólisis de la TRH en el espacio extracelular por la PPII de los tunicitos y por la tiroliberinasa permite la inhibición del eje tiroideo, pero los reguladores de estas isofórmulas durante el ayuno aún son desconocidos.

La relevancia fisiológica del aumento de actividad de PPII podría manifestarse mediante un experimento en donde se inhiba la actividad de la enzima en la eminencia media mediante algún inhibidor específico durante el ayuno y determinar si esto revierte la disminución de TSH, pues al inhibir a la enzima PPII se aumentaría la vida media de la TRH y probablemente se evitaría la caída de TSH circulante. Para abordar el objetivo 3, durante el transcurso de la escritura de este trabajo, el laboratorio adquirió un ratón que carece del gen de la PPII, el cual fue sometido a ayuno. El ratón Knock Out (KO) en condiciones control tiene una caída importante de la actividad de la PPII en el cerebro completo, indicando que el gen fue eliminado (Figura apéndice 10.3). Para determinar el efecto de la delección del gen de la PPII sobre la respuesta del eje tiroideo al ayuno, sometimos a 24 horas de ayuno a ratones silvestres homocigos (wild type, +/+), heterocigos (+/-) y homocigos (-/-) para el gen de la PPII. En este experimento encontramos que el ratón nulo para PPII no sufre una caída tan profunda de TSH en el suero si se le compara con el ratón homocigo y heterocigo. Esto sugiere que la PPII es necesaria para la caída profunda de la TSH y por lo tanto, para la reducción completa de la actividad del eje tiroideo en el ayuno (ver apéndice, sección 10.3). Esto significa que a pesar de la caída del RNAm de TRH en el PVN sigue existiendo cierta liberación de TRH al sistema portal que puede llegar a la pituitaria anterior, como ya se había demostrado anteriormente. También significa que los tirotrópos son sensibles a TRH en el ayuno, como ya se había demostrado mediante la administración de TRH exógeno a ratas sometidas a ayuno. Por lo tanto, la enzima PPII juega un papel muy importante en la regulación negativa del eje tiroideo durante el ayuno (figura 8).

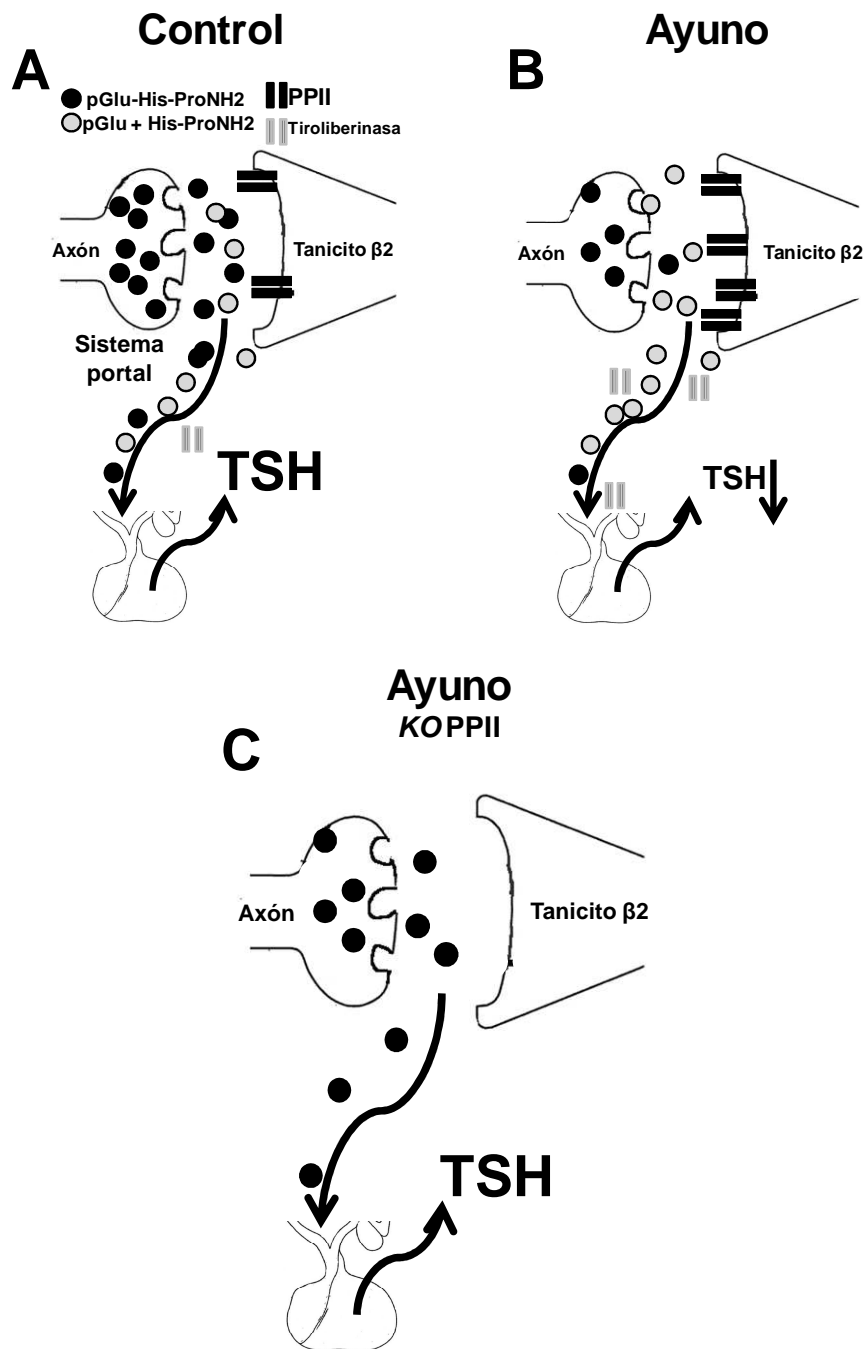


Figura 8. Respuesta del ratón nulo para la PPII en el ayuno. A.- En un roedor alimentado ad libitum hay una expresión y secreción basal de TRH cuya acción sobre la pituitaria anterior es inducir la liberación de TSH. B.- En el ayuno, el aumento en la expresión y actividad de la PPII de la eminencia media, en conjunto con la tiroliberinasa, aumentan la hidrólisis de TRH, disminuyendo la liberación de TSH. C.- En el ayuno, en un ratón nulo para la PPII, la disminución de TSH no se ve afectada de manera profunda como en un ratón silvestre.

Finalmente, con propósitos de investigar si el cambio en la actividad de PPII observado en machos ocurre en las hembras, un realizamos un experimento de ayuno por 36, 48, 60 y 72 horas, para determinar el efecto del ayuno sobre la actividad de PPII en la eminencia media y de la tiroliberinasa del suero. Similar a estudios anteriores, el ayuno no presenta ningún cambio en la TSH sérica, a diferencia de los machos, pero presentó un aumento de la corticosterona o una tendencia hacia arriba en las hembras sometidas ayuno (ver apéndice, sección 10.4). En cuanto a actividad de PPII, las hembras no mostraron cambios en la actividad de PPII de la eminencia media, ni en la actividad de la tiroliberinasa del suero. Esto sugiere que en el ayuno, la regulación del eje tiroideo es dependiente del sexo. Estas diferencias pudieran estar asociadas a funciones gonadales, ya que se ha demostrado que la gonadectomía previene la caída de la TSH durante el ayuno y la administración de andrógenos permite nuevamente la disminución de TSH (Cohen III et al., 1989). Esto sugiere que las gónadas de los machos contienen factores que promueven una inhibición del eje tiroideo.

9.- Conclusiones

-Nuestro modelo de ayuno produce cambios en el eje tiroideo consistentes con la literatura (disminución de la expresión de TRH en el núcleo paraventricular, disminución de la concentración sérica de TSH, disminución de las hormonas tiroideas, disminución del peso corporal, aumento en la corticosterona sérica).

-Encontramos en el ayuno un aumento de la actividad de PPII en la eminencia media en dos experimentos independientes así como un incremento transitorio en el nivel de RNAm en los tanicitos, adicionalmente encontramos un aumento en la expresión y actividad de la tiroliberinasa.

-No encontramos un aumento de la actividad de la PPII de adenohipófisis ni en la corteza parietal.

-La administración exógena de corticosterona no afecta la actividad de PPII en suero ni en la eminencia media.

-La administración de leptina exógena mediante bombas osmóticas durante el ayuno, no elevó los valores de leptina a nivel control, quizá esto explica la ausencia en los cambios en la actividad de PPII de tanicitos y la tiroliberinasa.

-El ratón nulo para PPII nulo para la PPII disminuye la respuesta a la disminución de TSH circulante por el ayuno.

- La actividad de PPII en la eminencia media, de tiroliberinasa y de otros parámetros relacionados con el eje tiroideo no cambiaron en ratas hembra sometidas a ayuno.

-Todo esto sugiere que durante el ayuno un cambio transitorio del nivel de RNA de PPII en los tanicitos induce un incremento de actividad de PPII en la eminencia media así como un incremento en la actividad de la tiroliberinasa sérica. En conjunto estos cambios de actividad pudieran incrementar la hidrólisis del TRH en el medio extracelular cercano a los vasos portales de la pituitaria, y en los mismos vasos portales. El incremento de la hidrólisis del TRH debería reducir la capacidad del hipotálamo de controlar positivamente la secreción de TSH. Para la eminencia media, estos cambios parecen ser posteriores a los cambios iniciales en la actividad del eje tiroideo por lo que pudieran contribuir a mantenerlo apagado a largo plazo, mientras que la tiroliberinasa pudiera contribuir en los tiempos iniciales en ratas macho.

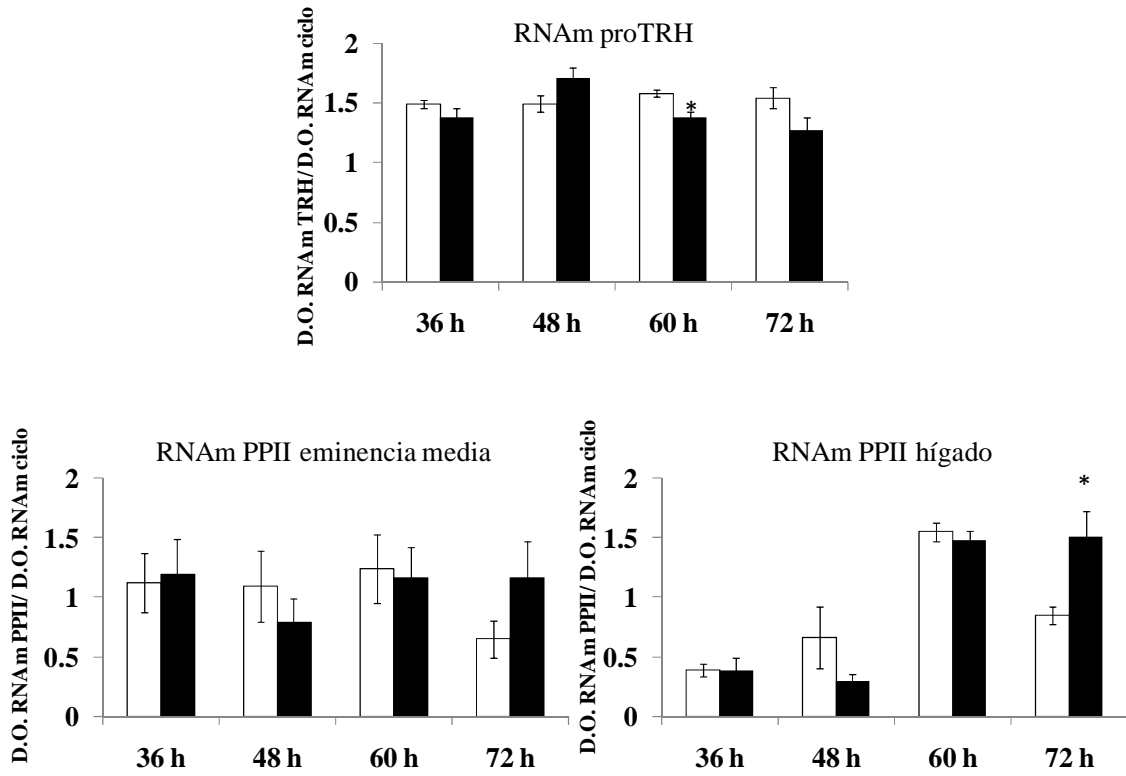
10.- Apéndice

10.1 Efecto del ayuno y la administración exógena de leptina sobre el eje tiroideo.

El objetivo de este experimento fue determinar el papel de la leptina en la regulación de la PPII de la eminencia media y de la tiroliberinas. Las ratas fueron implantadas con una minibomba conteniendo vehículo (solución salina y BSA) o leptina (400 ug/100 uL) y se dejaron recuperar 24 horas antes de someterse al protocolo de ayuno. Para el protocolo de ayuno, seis ratas implantadas con una mini bomba conteniendo vehículo recibieron agua y alimento *ad libitum*, otras seis ratas implantadas con una mini bomba conteniendo vehículo se sometieron a 72 horas de ayuno, y seis ratas implantadas con una mini bomba conteniendo leptina fueron sometidas a ayuno. Los animales se sacrificaron por decapitación y se obtuvo el cerebro, la adenohipófisis y el suero para los análisis indicados en la tabla.

<i>Experimento ayuno más leptina</i>	<i>Control</i>	<i>Ayuno 72 h</i>	<i>Ayuno más leptina</i>
<i>PPII eminencia media (AT)</i>	18.8 +/- 2.8	28.7 +/- 2.6 *	26.5 +/- 5.1
<i>Tiroliberinas (AE)</i>	0.68 +/-0.05	0.79 +/- 0.07	0.81 +/- 0.06
<i>Leptina en el suero (ng/mL)</i>	2.21 +/- 0.25	0.43 +/- 0.06 **	0.9 +/- 0.21*
<i>Ganancia de peso (g)</i>	3.6 +/- 1.9	-37 +/- 1.5 ***	-33 +/- 2.0 ***
<i>TSH (ng/ml)</i>	1.75 +/- 0.47	1.06 +/- 0.2	1.3 +/- 0.2
<i>Corticosterona (ng/mL)</i>	36.56 +/- 11.5	234.8 +/- 26 ***	257 +/- 62.6 ***

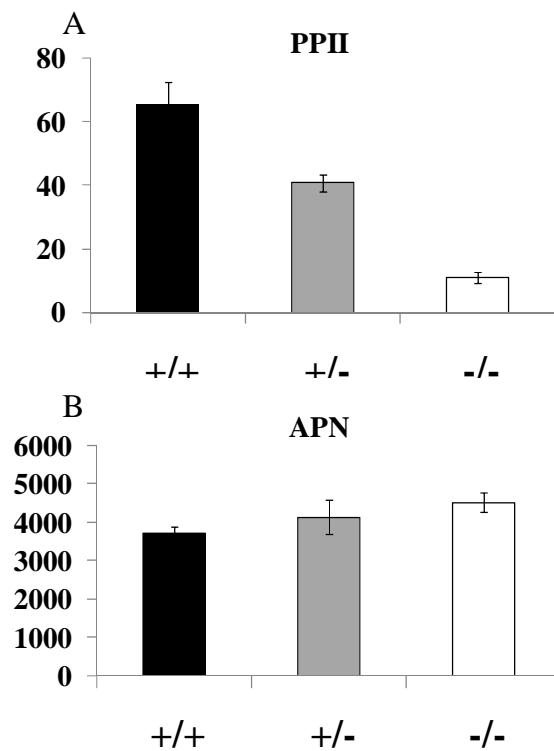
10.2.- Efecto del ayuno sobre el RNAm de proTRH y el RNAm de PPII



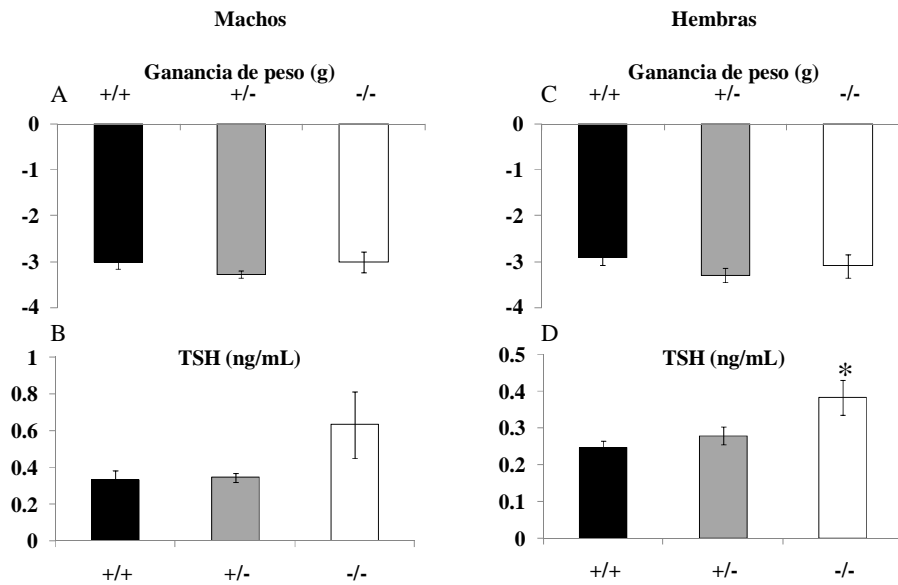
Se muestra el efecto del ayuno sobre el RNAm de pro TRH y PPII de la eminencia media y en el hígado. Las ratas fueron sometidas a diferentes horas de ayuno y se sacrificaron por decapitación. Posteriormente se extrajo el RNA total de el NPV, la eminencia media y el hígado. Los datos muestran la media \pm el error estándar. n=5. * p < 0.05. Barras blancas: control; barras negras: ayuno.

10.3.- Efecto del ayuno en ratones que carecen del gen de la PPII

Como parte del objetivo 3, utilizamos ratones adultos de ambos géneros que no expresan a la enzima PPII y fueron sometidos a 24 horas de ayuno. Previo a esto analizamos que la actividad de PPII en el cerebro completo tuviera una caída en la actividad en el raton KO para PPII. Al mismo tiempo, analizamos que la caída en la actividad de PPII fuese específica y analizamos la actividad de la aminopeptidasa N en el cerebro completo. La aminopeptidasa N es un miembro de la misma familia de peptidasas dependientes de zinc (familia M1)



Actividad específica de PPII y de la aminopeptidasa N en el cerebro de tres diferentes fenotipos de ratón. A.- Se muestra la actividad específica de PPII del cerebro de ratón. B.- Se muestra la actividad específica de la aminopeptidasa N (APN) del cerebro de ratón.



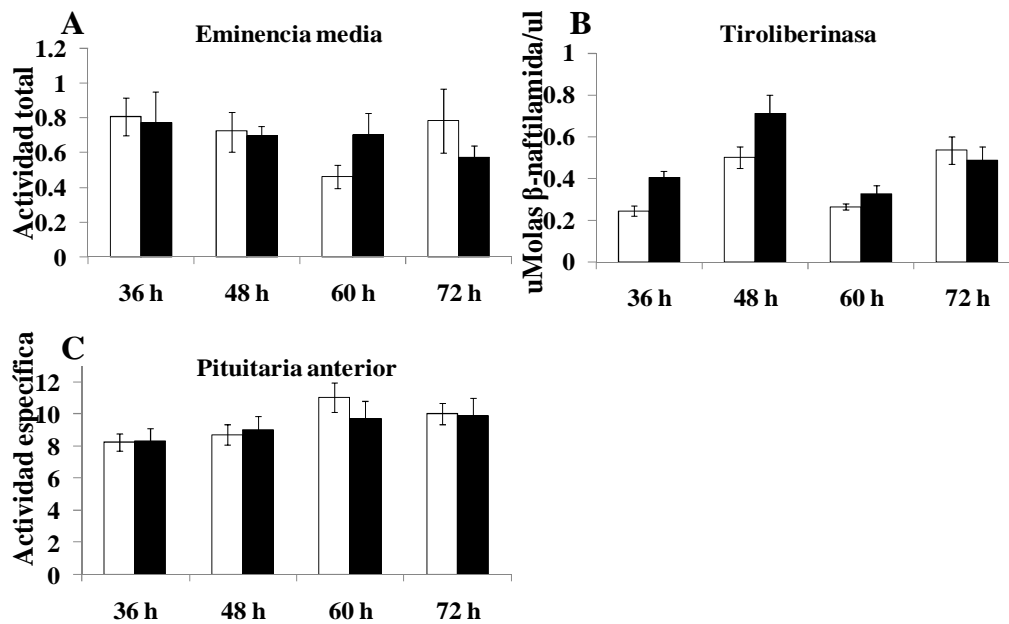
Efecto de 24 horas de ayuno, sobre la TSH sérica en ratones wild type (+/+), heterócigos (+/-) y homócigos (-/-) para la enzima PPII. Los datos muestran la media \pm el error estándar. $n=7-19$. * $p \leq 0.05$. Los valores de TSH circulantes en animales con alimento *ad libitum* y analizados en experimentos que no fueron parte de este trabajo son para los machos wild type = 1.04 ± 0.3 ; heterócigos = 0.66 ± 0.01 y homócigos = 0.55 ± 0.01 , mientras que para las hembras los valores en condiciones de alimento *ad libitum* fueron wild type = 0.81 ± 0.2 ; heterócigos = 1.01 ± 0.5 y homócigos = 0.93 ± 0.04 .

10.4.- Efecto del ayuno en ratas hembra adultas

Como parte de los objetivos, comparamos la respuesta del eje tiroideo al ayuno en ratas hembra adultas.

Efecto del ayuno sobre la ganancia de peso y parámetros hormonales relacionados con el eje tiroideo.

	<i>Control</i> 36 h	<i>Ayuno 36</i> h	<i>Control</i> 48 h	<i>Ayuno 48</i> h	<i>Control</i> 60 h	<i>Ayuno 60</i> h	<i>Control</i> 72 h	<i>Ayuno</i> 72 h
<i>Ganancia de peso (g)</i>	1.2 +/- 1.49	-21 *** +/- 0.89	-1.4 +/-1.50	-24.4*** +/- 0.81	-0.2 +/- 2.3	-27.4*** +/- 1.91	0.0 +/- 1.34	-33*** +/- 0.89
<i>TSH (ng/ml)</i>	0.68 +/- 0.05	0.48 +/- 0.07	0.96 +/- 0.17	0.60 +/- 0.011	0.93 +/- 0.12	0.81 +/- 0.09	0.89 +/- 0.10	0.72 +/- 0.12
<i>T4 (ng/dL)</i>	6.9 +/- 1.2	5.7 +/- 0.5	nd	nd	3.7 +/- 0.6	3.8 +/- 1.0	nd	nd
<i>Corticosterona (ng/mL)</i>	299.4 +/- 99.4	965.8*** +/- 103	418 +/- 82.6	469.4 +/- 68	102.4 +/- 29	618.2*** +/- 45.6	483.4 +/- 147.4	590 +/- 88.6



Efecto del ayuno sobre la actividad de PPII de diferentes compartimentos en ratas hembras. Las ratas hembra adultas fueron sometidas a diferentes periodos de ayuno, de manera similar a la descrita para machos, y posteriormente sacrificadas por decapitación. A.- El ayuno no afecta la actividad total (pMolas de β -Naftilamida/minuto/tejido) de la PPII de la eminencia media (n=4-5). B.- El ayuno no afecta la actividad de la tiroliberinasa en el suero (pMolas de β -Naftilamida/minuto/ul de suero) (n=4-5). El ayuno no afecta la actividad específica de la PP (pMolas de β -Naftilamida/minuto/mg de proteína) (n=4-5). Barras blancas: control; barras negras: ayuno.

11.- Bibliografía

- Addis, T., Poo, L. J. and Lew, W. (1936). The quantities of protein lost by the various organs and tissues of the body during a fast. *J. Biol. Chem.* 115, 111-116.
- Ahima, R. S., Saper, C. B., Flier, J. S. and Elmquist, J. K. 2000. Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinol.* 21:263-307.
- Alkemade, A., Friesema, E. C., Kalsbeek, A., Swaab, D. F., Visser, T. J. and Fliers, E. 2011. Expression of thyroid hormone transporters in the human hypothalamus. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;96(6):E967-71.
- Alvarez-Salas E1, Aceves C, Anguiano B, Uribe RM, García-Luna C, Sánchez E, de Gortari P. Food-restricted and dehydrated-induced anorexic rats present differential TRH expression in anterior and caudal PVN. Role of type 2 deiodinase and pyroglutamyl aminopeptidase II. *Endocrinology.* 2012 Aug;153(8):4067-76. doi: 10.1210/en.2011-2011. Epub 2012 Jun 19.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., Rasika, S., Falluel-Morel, A., Anouar, Y., Dehouck, B., Trinquet, E., Jockers, R., Bouret, S. G. and Prévot, V. 2014. Hypothalamic tanycytes are an ERK-gated conduit for leptin into the brain. *-Cell Metab.* Feb 4;19(2):293-301.
- Barsh, G. S. and Schwartz, M. W. 2002. Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nature Reviews. Genetics.* Aug;3(8):589-600.
- Bates, J. M., St Germain, D. L., Galton, V. A. 1999. Expression profiles of the three iodothyronine deiodinases, D1, D2, and D3, in the developing rat. *Endocrinology.* 1999 Feb;140(2):844-51.
- Bauer K. *Nature.* Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. 1987 Nov 26-Dec 2;330(6146):375-7.
- Bauer, K. 1988. Degradation and biological inactivation of thyrotropin-releasing hormone (TRH). Regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie (Paris).* 70: 69-74.
- Bauer, K., Carmeliet, P., Schulz, M., Baes, M. and Denef, C. (1990). Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology.* 127:1224-33.
- Bauer, K., and Nowak, P. 1979. Characterization of a thyroliberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *European Journal of Biochemistry.* 99: 239-246.
- Bauer, K., Nowak, P., and Kleinkauf, H. 1981. Specificity of a serum peptidase hydrolyzing thyroliberin at pyroglutamyl-histidine bond. *European Journal of Biochemistry.* 118: 173-176.
- Blake, N.G., Eckland, D. J., Foster, O. J., Lightman, S. L. 1991. Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology.* Nov;129(5):2714-8.
- Boelen, A., Kwakkel, J., Vos, X. G., Wiersinga, W. M and Fliers E. 2006. Differential effects of leptin and refeeding on the fasting-induced decrease of pituitary type 2 deiodinase and thyroid hormone receptor beta2 mRNA expression in mice. *J Endocrinol.* Aug; 190(2):537-44.

- Bouret, S. G., Draper, S. J. and Simerly, R. B. 2004. Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *Journal of the Neuroscience*. Mar 17;24(11):2797-805.
- Brabant, G., Ocran, K., Ranft, U., von zur Mühlen, A. and Hesch, R.D. 1989. Physiological regulation of thyrotropin. *Biochimie*. Feb;71(2):293-301.
- Cabral, A., Fernandez, G. and Perello M. 2013. Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience*. Dec 3;253:406-15.
- Cruz, R. Vargas, M. A. Uribe, R. M. Pascual, I. Lazcano, I. Yiotakis, A. Matziari, M. Joseph-Bravo, P. Charli, J.L. 2008. Anterior pituitary pyroglutamyl peptidase II activity controls TRH-induced prolactin release. *Peptides*, 29, 1953-1964.
- Challet, E., le Maho, Y., Robin, J. P., Malan, A. and Cherel Y (2005). Involvement of corticosterone in the fasting-induced rise in protein utilization and locomotor activity. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995 Mar;50(3):405-12.
- Charli, J. L., Mendez, M., Joseph-Bravo, P. and Wilk, S. (1987). Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change the *in vitro* release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides*. 9: 373-8.
- Charli, J. L., Vargas, M. A., Cisneros, M., de Gortari, P., Baeza, M. A., Jasso, P., Bourdais, J., Pérez, L., Uribe, R. M. and Joseph-Bravo, P. TRH inactivation in the extracellular compartment: role of pyroglutamyl peptidase II. *Neurobiology (Bp)*. 1998;6(1):45-57.
- Charli, J. L., Pascual I., Cruz R., and Vargas M .A. (2006). Post-secretory inactivation of peptides in the hypothalamic-adenohypophyseal axis. Focus on pyroglutamyl peptidase II, the thyrotropin releasing hormone inactivating ectoenzyme, in *Molecular Endocrinology*. Pags 39-64. Edit. Joseph-Bravo. Research Signpost.
- Chatamara, K., Daniel, P. M. and Lam, D. K. C. 1984. The effects of fasting on core temperature, blood glucose, and body and organ weights in rats. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 69: 541-545.
- Cheng, S.Y., Leonard, J.L. and Davis, P.J., 2010. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr. Rev.* 31, 139–170.
- Cherel, Y., Robin, J. P., Heitz, A., Calcari, C. and Le Maho, Y. 1992. Relationships between lipid availability and protein utilization during prolonged fasting. *J Comp Physiol B*. 1992;162(4):305-13.
- Cohen, J. H. 3rd., Alex, S., DeVito, W. J., Braverman, L. E. and Emerson, C. H., *Endocrinology*. 1989 Jun;124(6):3025-9. Fasting-associated changes in serum thyrotropin in the rat are influenced by gender.
- Coppola, A., Meli, R. and Diano S. Inverse shift in circulating corticosterone and leptin levels elevates hypothalamic deiodinase type 2 in fasted rats. *Endocrinology*. 2005, Jun;146(6):2827-33.
- Cummins, P., and O'Connor B. 1998. Pyroglutamyl aminopeptidase: An overview of the three known enzymic forms. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1429: 1-17.
- Diano, S., Naftolin, F., Goglia, F. and Horvath, T. L. 1998. Fasting-induced increase in type II iodothyronine deiodinase activity and messenger ribonucleic acid levels is not reversed by thyroxine in the rat hypothalamus. *Endocrinology*. Jun;139(6):2879-84.
- Elias, C. F., Lee, C., Kelly, J., Aschkenasi, C., Ahima, R. S., Couceyro, P. R., Kuhar, M. J., Saper, C. B. and Elmquist, J. K. 1998. Leptin activates hypothalamic CART neurons projecting to the spinal cord. *Neuron*. Dec;21(6):1375-85.

- Fekete, C., Légrádi, G., Mihály, E., Huang, Q. H., Tatro, J. B., Rand, W. M., Emerson, C. H. and Lechan, R. M. alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci.* 2000a Feb 15;20(4):1550-8.
- Fekete, C., Mihály, E., Luo, L. G., Kelly, J., Clausen, J. T., Mao, Q., Rand, W. M., Moss, L. G., Kuhar, M., Emerson, C. H., Jackson, I. M. and Lechan RM. *J Neurosci.* 2000. J Neurosci. 2000 Dec 15;20(24):9224-34. Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. Dec 15;20(24):9224-34.
- Fekete, C., Sarkar, S., Rand, W. M., Harney, J. W., Emerson, C. H., Bianco, A. C. and Lechan RM. 2002. Agouti-related protein (AGRP) has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis; comparisons between the effect of AGRP and neuropeptide Y on energy homeostasis and the HPT axis. *Endocrinology.* 2002 Oct;143(10):3846-53.
- Fekete, C., Singru, P. S., Sanchez, E., Sarkar, S., Christoffolete, M. A., Riberio, R. S., Rand, W. M., Emerson, C. H., Bianco, A. C. and Lechan, R. M. Differential effects of central leptin, insulin, or glucose administration during fasting on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and feeding-related neurons in the arcuate nucleus. *Endocrinology.* 2006 Jan;147(1):520-9.
- Fekete, C., and Lechan, R. M. 2007. Negative feedback regulation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH) synthesizing neurons; role of neuronal afferents and type 2 deiodinase. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 28; 97–114.
- Fekete, C. and Lechan, R. M. 2014. Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev.* 2014 Apr;35(2):159-94.
- Fortunato, R. S., Ignácio, D. L., Padron, A. S., Peçanha, R., Marassi, M. P., Rosenthal, D., Werneck-de-Castro, J. P. and Carvalho, D. P. 2008. The effect of acute exercise session on thyroid hormone economy in rats. *J Endocrinol.* Aug;198(2):347-53.
- Friedman MI, Stricker EM. 1976. The physiological psychology of hunger: a physiological perspective. *Psychological review Rev.* Nov;83(6):409-31.
- Friedman, T. C., and Wilk, S. 1985. The effect of inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase on TRH degradation in rat serum. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 132: 787-794
- Gagnon, A., Antunes, T. T., Ly, T., Pongsuwan, P., Gavin, C., Lochnan, H. A. and Sorisky, A. 2010. Thyroid-stimulating hormone stimulates lipolysis in adipocytes in culture and raises serum free fatty acid levels in vivo. *Metabolism.* Apr;59(4):547-53.
- Galton, V. A., Hernandez, A., St Germain, D. L. 2014. The 5'-deiodinases are not essential for the fasting-induced decrease in circulating thyroid hormone levels in male mice: possible roles for the type 3 deiodinase and tissue sequestration of hormone. *Endocrinology.* Aug;155(8):3172-81.
- Gary, K. A., Sevarino, K. A., Yarbrough, G.G., Prange JR, A. J., and Winokur A. 2003. The Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) hypothesis of homeostatic regulation: implications for TRH-based therapeutics. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 305: 410-416.

- Gavin LA, Bui F, McMahon F, Cavalieri RR. 1980. Sequential deiodination of thyroxine to 3,3'-diiodothyronine via 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5'-triiodothyronine in rat liver homogenate. The effects of fasting versus glucose feeding. *J Biol Chem.* 1980 Jan 10;255(1):49-54.
- Gehlert, D. R. 1999. Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides.* Oct;33(5):329-38.
- Grill HJ, Hayes MR. The nucleus tractus solitarius: a portal for visceral afferent signal processing, energy status assessment and integration of their combined effects on food intake. *Int J Obes (Lond).* 2009 Apr;33 Suppl 1:S11-5.
- Hahn, T. M., Breininger, J. F, Baskin, D. G., Schwartz, M. W. 1998. Coexpression of *Agrp* and *NPY* in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci.* 1998 Aug;1(4):271-2.
- Harris, A. R., Fang, S. L., Azizi, F., Lipworth, L., Vagenakis, A. G. and Barverman LE. 1978. Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat. *Metabolism.* Sep;27(9):1074-83.
- van Haasteren GA1, Linkels E, van Toor H, Klootwijk W, Kaptein E, de Jong FH, Reymond MJ, Visser TJ, de Greef WJ. Effects of long-term food reduction on the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male and female rats. *J Endocrinol.* 1996 Aug;150(2):169-78.
- Havel, P. J. 2011. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Experimental Biology and Medicine.* 226(11):963-77.
- Hayes, M. R., Skibicka, K. P., Lechner, T. M., Guarnieri, D. J., DiLeone, R.J., Bence, K. K. and Grill, H. J. Endogenous leptin signaling in the caudal nucleus tractus solitarius and area postrema is required for energy balance regulation. *Cell Metab.* 2010 Jan;11(1):77-83.
- Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E.,C., de Jong, M., Krenning, E. P. and Visser, T. J. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev.* 2001 Aug;22(4):451-76.
- Heuer, H., Maier, M. K., Iden, S., Mittag, J., Friesema, E. C., Visser, T. J. and Bauer, K. 2005. The monocarboxylate transporter 8 linked to human psychomotor retardation is highly expressed in thyroid hormone-sensitive neuron populations. *Endocrinology.* Apr;146(4):1701-6.
- Heuer, H., Ehrchen, J., Bauer, K. and Schäfer, M. K. 1998. Region-specific expression of thyrotrophin-releasing hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *European Journal of Neuroscience.* Apr;10(4):1465-78.
- Horvath T. L., Diano, S., Sotonyi, P., Heiman, M. and Tschöp, M. 2001. Ghrelin and the Regulation of Energy Balance, A Hypothalamic Perspective. *Endocrinology.* 142: 4163-69.
- Hurd, H. P. 2nd., Palumbo, P. J. and Gharib H. 1977. Hypothalamic-endocrine dysfunction in anorexia nervosa. *Mayo Clin Proc.* Nov; 52(11):711-6.
- Jaimes-Hoy, L., Joseph-Bravo, P., de Gortari, P. 2008. Differential response of TRHergic neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in female animals submitted to food-restriction or dehydration-induced anorexia and cold exposure. *Hormones and Behavior.* Feb;53(2):366-77.
- Joseph-Bravo, P., Uribe, R. M., Vargas M. A., Pérez-Martínez L., Zoeller R.T, and Charli J. L. (1998). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 18: 231–247.

- Kádár, A., Sánchez, E., Wittmann, G., Singru, P. S., Füzesi, T., Marsili, A., Larsen, P. R., Liposits, Z., Lechan, R. M. and Fekete, C. 2011. Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse. *J Comp Neurol*. Oct 1; 518(19):3948-61.
- Kakucska, I, Qi, Y. and Lechan, R. M. 1995. Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*. Jul;136(7):2795-802.
- Klieverik, L., P., Janssen, S. F., van Riel, A., Foppen, E., Bisschop, P. H., Serlie, M. J., Boelen, A., Ackermans, M. T., Sauerwein, H. P., Fliers, E. and Kalsbeek, A. 2009 Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 7;106(14):5966-71.
- Kobayashi, H., Matsui, T. and Ishiji, S. Functional electron microscopy of the hypothalamic median eminence. 1970. *Int. Rev. Cytol*. 29,281 -381.
- Komaki, G., Tamai, H., Kiyohara, K., Fukino, O., Nakagawa, T., Mori, S., Kumagai, L. F. and Nagataki, S. 1986 Changes in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during acute starvation in non-obese patients. *Endocrinologia Japonica*. Jun; 33(3):303-8.
- Koubi, H. E., Robin, J. P., Dewasmes, G., Le Maho, Y., Frutoso, J. and Minaire, Y. 1991. Fasting-induced rise in locomotor activity in rats coincides with increased protein utilization. *Physiol Behav*. 1991 Aug;50(2):337-43.
- Langin, D., Holm, C. and Lafontan, M. 1996. Adipocyte hormone-sensitive lipase: a major regulator of lipid metabolism. *Proc Nutr Soc*. 1996 Mar;55(1B):93-109.
- Légrádi G, Emerson C. H., Ahima R. S., Flier J. S., Lechan R. M. 1997. Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*.138:2569-76.
- Lee, D. A., Bedont, J. L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., Takiar, V., Charubhumi, V., Balordi, F., Takebayashi, H., Aja, S., Ford, E., Fishell, G. and Blackshaw S. 2012. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*. Mar 25;15(5):700-2.
- Legradi, G., Emerson, C.H., Ahima, R. S., Rand, W. M., Flier, J. S. and Lechan R. M. 1998. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of ProTRH mRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology*. Aug;68(2):89-97.
- Martinez-deMena, R., Anedda, A., Cadenas, S. and Obregon, M. J. 2015. *Mol Cell Endocrinol*. Mar 15;404:151-8.
- Mayer, S., Müller, J., Bauer, R., Richert, S., Kassmann, C. M., Darras, V. M., Buder, K., Boelen, A., Visser, T. J. and Heuer, H. Transporters MCT8 and OATP1C1 maintain murine brain thyroid hormone homeostasis. 2014 *J Clin Invest*. May;124(5):1987-99.
- Mebis, L. and Van den Berghe G. 2011. Thyroid axis function and dysfunction in critical illness. *Best Practice and Research. Clinical Endocrinology and Metabolism*. Oct;25(5):745-57.
- Mendez, M., Cruz, C., Joseph-Bravo, P., Wilk, S., and Charli, J. L. 1990. Evaluation of the role of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH brain. *Neuropeptides*. 17: 55-62.
- Mullur, R., Liu, Y. Y. and Brent, G. A. Thyroid hormone regulation of metabolism. *Physiol Rev*. 2014 Apr;94(2):355-82.
- Nillni, E. A., Luo, L. G., Jackson, I. M. D., and McMillan, P. (1996). Identification of the precursor, its processing products and its coexpression with convertase 1 (PC1) in primary

- cultures of hypothalamic neurons. Anatomic localization of PC1 and PC2. *Endocrinology*. 137; 5651-5661.
- Niwa, A., Nishibori, M., Hamasaki, S., Kobori, T., Liu, K., Wake, H., Mori, S., Yoshino, T. and Takahashi, H. Voluntary exercise induces neurogenesis in the hypothalamus and ependymal lining of the third ventricle. 2015. *Brain Structure and Function*. Jan 30. [Epub ahead of print].
- O'leary, R. and O'Connor, B (1995). Thyrotropin-releasing-hormone. *Journal of Neurochemistry*. 65: 953- 963.
- Orozco A1, Navarrete-Ramírez P2, Olvera A2, García-G C3. 2014. 3,5-Diiodothyronine (T2) is on a role. A new hormone in search of recognition. *Gen Comp Endocrinol*. Jul 1;203:174-80.
- Perello, M. and Nillni, E. A. 2007. The biosynthesis and processing of neuropeptides: lessons from prothyrotropin releasing hormone (proTRH). *Front Biosci*. 2007 May 1;12:3554-65.
- Remers, F., and Delemarre-van de Waal HA. 2011. Developmental Programming of Energy Balance and Its Hypothalamic Regulation. *Endocrine Reviews*. 32: 272–311.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Pastor, F. E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B. and Amat, P. 2005. Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. *Hypothalamic Tanycytes: A Key Component of Brain–Endocrine Interaction. International Review of cytology*. 247: 89-164.
- Sainsbury, A., and Zhang, L. 2011. Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obesity Reviews*. 13(3):234-57.
- Salvatierra, J., Lee, D. A., Zibetti, C., Duran-Moreno, M., Yoo, S., Newman, E. A., Wang, H., Bedont, J. L., de Melo, J., Miranda-Angulo, A. L., Gil-Perotin, S., Garcia-Verdugo, J. M. and Blackshaw, S. 2014. The LIM homeodomain factor *Lhx2* is required for hypothalamic tanycyte specification and differentiation. *J Neurosci*. Dec 10;34(50):16809-20.
- Sánchez, E., Singru, P. S., Acharya, R., Bodria, M., Fekete, C, Zavacki, A. M., Bianco, A. C. and Lechan, R. M. 2008. Differential effects of refeeding on melanocortin-responsive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*. Sep;149(9):4329-35.
- Sánchez, E., Vargas, M. A., Singru, P. S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., Charli, J. L. and Lechan, R. M. 2009. Tanycyte pyroglutamyl peptidase II contributes to regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis through glial-axonal associations in the median eminence. *Endocrinology*. 150 :2283–2291.
- Sanger, G. J. and Lee, K. 2008. Hormones of the gut-brain axis as targets for the treatment of upper gastrointestinal disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2008 Mar;7(3):241-54.
- Schaeffer, M., Langlet, F., Lafont, C., Molino, F., Hodson, D. J., Roux, T., Lamarque, L., Verdié, P., Bourrier, E., Dehouck, B., Banères, J. L., Martinez, J., Méry, P. F., Marie, J., Trinquet, E., Fehrentz, J. A., Prévot, V. and Mollard P. 2013. Rapid sensing of circulating ghrelin by hypothalamic appetite-modifying neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences from United States from America*. Jan 22;110(4):1512-7.
- Schwartz, C. E., May, M. M., Carpenter, N. J., Rogers, R. C., Martin, J., Bialer, M. G., Ward, J., Sanabria, J., Marsa, S., Lewis, J. A., Echeverri, R., Lubs, H. A., Voeller, K., Simensen, R. J. and Stevenson, R. E. 2005. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. *Am J Hum Genet*. Jul;77(1):41-53.

- Spaeth, A. M., Kanoski, S. E., Hayes, M. R. and Grill, H. J. TrkB receptor signaling in the nucleus tractus solitarius mediates the food intake-suppressive effects of hindbrain BDNF and leptin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 May 1;302(10):E1252-60.
- Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J., and Bauer, K. 1994. Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin releasing hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 91: 9534–9538.
- Schmitmeier, S., Thole, H., Bader, A., and Bauer, K. 2002. Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone (TRH)-degrading serum enzyme and its identification as a product of liver origin. *European Journal of Biochemistry.* 269:1278-1286.
- Shi, Z. X., Levy, A. and Lightman, S.L. 1993. The effect of dietary protein on thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin gene expression. *Brain Research.* Mar 19;606(1):1-4.
- Silva, J. E. 2006. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological Reviews.* 86: 435-64.
- Solomon, A., De Fanti, B. A. and Martínez, J. A. 2006 The nucleus tractus solitari (NTS) participates in peripheral ghrelin glucostatic hunger signalling mediated by insulin. *Neuropeptides.* Jun;40(3):169-75.
- Steyn, F. J., Leong, J. W., Huang, L., Tan, H. Y., Xie, T. Y., Nelson, C., Waters, M. J., Veldhuis, J. D., Epelbaum, J. and Chen, C. 2012. GH Does Not Modulate the Early Fasting-Induced Release of Free Fatty Acids in Mice. *Endocrinology.* 153:273-82.
- Straub, R. E., Frech, G. C., Joho, R. H. and Gershengorn, M. C. 1990. Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Dec;87(24):9514-8.
- Sugiyama, D., Kusuhara, H., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Nozaki, Y., Aburatani, H. and Sugiyama, Y. 2003 Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem.* Oct 31;278(44):43489-95.
- Sztalryd, C. and Kraemer, F. B. 1994. Regulation of hormone-sensitive lipase during fasting. *Am J Physiol.* 1994 Feb;266(2 Pt 1):E179-85.
- Tischler ME, Henriksen EJ, Cook PH. 1988. Role of glucocorticoids in increased muscle glutamine production in starvation. *Muscle Nerve.* Jul;11(7):752-6.
- Toshinai K, Mondal MS, Nakazato M, Date Y, Murakami N, Kojima M, Kangawa K, Matsukura S. 2001. Upregulation of Ghrelin Expression in the Stomach upon Fasting, Insulin-Induced Hypoglycemia, and Leptin Administration. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 281: 1220–1225.
- Tu, H. M., Kim, S. W., Salvatore, D., Bartha, T., Legradi, G., Larsen, P. R., Lechan, R. M. 1997 Regional distribution of type 2 thyroxine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat hypothalamus and pituitary and its regulation by thyroid hormone. *Endocrinology* 138:3359–3368
- Uribe, R. M., Joseph-Bravo, P., Pasten, J., Ponce, G., Méndez, M., Covarrubias, L., and Charli J.L. 1991. Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology.* 54: 493-498.
- Uribe RM, Redondo JL, Charli JL, Joseph-Bravo P. 1993. Suckling and cold stress rapidly and transiently increase TRH mRNA in the paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology.* 58:140-5.

- Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Ramírez-Martínez, C., García-Vázquez, A., Romero, F., Cisneros, M., Cote-Vélez, A., Charli, J. L. and Joseph-Bravo, P. 2014. Voluntary exercise adapts the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in male rats. *Endocrinology*. May;155(5):2020-30.
- Vargas, M. A., Méndez, M., Cisneros, M., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L.1987. Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neuroscience Letters*. 79: 311-314.
- Vargas, M. A., Herrera, J., Uribe, R. M., Charli, J. L., and Joseph-Bravo P. 1992. Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohipophysis and pancreas. *Developmental Brain Research*, 66: 251-256.
- Vargas, M. A., Joseph-Bravo, P., and Charli, J.L. 1994. Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology*. 60: 323-330.
- cultures of adenohipophyseal cells. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 184-193.
- Vargas, M. A., Cisneros, M., Joseph-Bravo P., and Charli, J.L (2002). TRH-induced down-regulation of pyroglutamyl aminopeptidase II activity involves L-type calcium channels and Cam kinase activities in cultures of adenohipophyseal cells. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 184-193.
- Cell Metab*. 2011 Dec 7;14(6):780-90. doi: 10.1016/j.cmet.2011.10.009. Epub 2011 Nov 17.
- NPY and MC4R signaling regulate thyroid hormone levels during fasting through both central and peripheral pathways.
- Vella, K. R., Ramadoss, P., Lam, F. S., Harris, J. C., Ye, F. D., Same, P. D., O'Neill, N. F., Maratos-Flier, E. and Hollenberg AN.
- Visser, W. E., Friesema, E. C., Jansen, J., and Visser, T. J. 2008. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab*. 2008 Mar;19(2):50-6.
- Walder, K., Lee, S., Zimmet, P. and Collier, G. R. 1998. Dysregulation of Leptin in Response to Fasting in Insulin-Resistant *Psammomys Obesus* (Israeli sand rats). *Metabolism*, 147: 125-128.
- Walter, R. 1976. Partial purification and characterization of PPCE: Enzymatic inactivation of neurohipophyseal hormones by kidney preparation of various species. *Biochimica et Biophysica Acta*. 442: 138-158.
- Weintraub, B. D., Gesundheit, N., Taylor, T., Gyves, P. W. 1989. Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. – *Annals of New York Academy of Science*. 553:205-13.
- Woodward, C. J., Hervey, G. R., Oakey, R. E. and Whitaker, E. M. The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats.
- Wren. , A. M., Seal, L. J., Cohen, M. A., Brynes, A. E, Frost, G. S, Murphy, K. G., Dhillon, W. S., Ghatei, M. A. and Bloom, SR. 2001. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Dec;86(12):5992.
- Yu H., Lopez E., Young S. W., Luo, J., Tian, H. and Cao P. 2006. Quantitative analysis of free fatty acids in rat plasma using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry with meso-tetrakis porphyrin as matrix. *Analytical Biochemistry*. Jul 15;354(2):182-91.

-Zawalich, W. S. and Zawalich, K. C. 2000. Glucose-induced insulin secretion from islets of fasted rats: modulation by alternate fuel and neurohumoral agonists. *Journal of Endocrinology*.166: 111–120.

