



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Optimización de cultivos de eminencia media de rata para estudiar la regulación de la expresión de la piroglutamil peptidasa II en tanicitos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

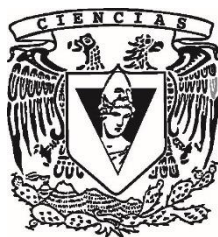
BEETSI EUGENIA URRIETA CHÁVEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. JEAN-LOUIS CHARLI CASALONGA

2017

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.





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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Urrieta
Chávez
Beetsi Eugenia
55 31 40 38 56
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
413003401

2. Datos del tutor

Dr.
Jean-Louis Joseph Marie
Charli
Casalonga

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Julio Eduardo Roque
Morán
Andrade

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María de Lourdes
Massieu
Trigo

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Rosa María
Uribe
Villegas

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Tatiana
Fiordelisio
Coll

7. Datos del trabajo escrito

Optimización de cultivos de eminencia media de rata para estudiar la regulación de la expresión de la piroglutamil peptidasa II en tunicos
71p.
2017

«[...] le ciel étoilé au-dessus de moi et la loi morale en moi. »

Immanuel Kant

Agradecimientos

A todo el grupo de trabajo del laboratorio 1 del Instituto de Biotecnología de la UNAM sin el cual el siguiente trabajo no podría haber sido realizado, en el cual quiero agradecer al Dr. Jean Louis Charli Casalonga y a la Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo por haberme permitido realizar mi proyecto de tesis en su laboratorio.

En especial al Dr. Jean Louis Charli Casalonga por aceptar la responsabilidad de dirigir mi proyecto y aprendizaje, por apoyarme siempre durante mi estancia en su laboratorio, y por transmitirme la pasión por los tunicitos.

A la Dra. María Juana Antonieta Cote Vélez y al M. en C. Adair Rodríguez Rodríguez, por su apoyo y enseñanza de las técnicas necesarias para el desarrollo del proyecto.

A la Quím. Fidelia Romero Arteaga por su apoyo técnico y académico al instruirme en los diferentes protocolos de Biología Molecular además de proveerme todo el material y reactivos para llevar a cabo los diversos experimentos.

Al QFB. Miguel Cisneros Ramírez por apoyarme en los experimentos de ensayo de actividad enzimática.

A la Dra. Rosa María Uribe Villegas por el apoyo en las técnicas utilizadas para la obtención de tejidos y en otras diversas cuestiones relacionadas al proyecto. A Técnico lab. Manuel Villa Herrera por proporcionarme el material de laboratorio necesario para los experimentos.

A todo el personal del Bioterio del IBT de la UNAM, la M.V.z. Elizabeth Mata Moreno, la MVZ Graciela Cabeza Pérez por proporcionarme todos los recursos para el manejo de los roedores utilizados, y a la Dra. Mariana Gutierrez Mariscal por la crianza y cuidado de los mismos.

A la unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN, por la síntesis de oligonucleótidos del IBT-UNAM, al M en C. Eugenio López Bustos.

Al CONACyT por el apoyo económico que me permitió residir en Cuernavaca a lo largo del desarrollo del proyecto.

Agradecimientos personales

- ∞ A Adair mi senpai, amigo y guía, gracias a quien cada error fue un aprendizaje.
- ∞ A los integrantes del laboratorio, Tony, Mariana, Rosa, por su apoyo, cuidado y amistad que hizo agradable cada día de trabajo.
- ∞ A mis compañeros y amigos del taller, André y Eli por compartir la experiencia y brindarme siempre su apoyo.
- ∞ A mi familia: mis hermanos Esteban y Lucía y mis padres, quienes siempre han estado conmigo y gracias a los cuales soy lo que soy en esencia.
- ∞ Finalmente, a Lauri, por enseñarme a aprender.

Índice

Agradecimientos	4
1.0 Resumen.....	8
2.0 Introducción	9
2.1 Balance energético corporal.....	9
2.2 La Hormona Liberadora de Tirotrópina y el eje HPT	11
2.3 Participación de los tanicitos en la regulación del balance energético	14
2.4 La piroglutamil peptidasa II	17
2.5 Cultivos de tanicitos	20
2.6 Expresión y actividad de la PPII en la eminencia media in vivo y en cultivos primarios de tanicitos.....	22
3.0 Justificación	28
4.0 Hipótesis	28
5.0 Objetivo General	29
5.1 Objetivos Particulares.....	29
6.0 Estrategia experimental	29
6.1 Métodos.....	30
6.1.1 Cultivo primario de tanicitos	30
6.1.2 Cultivo organotípico de hipotálamo/eminencia media.....	33
6.1.3 Procesamiento de las muestras para ensayo de actividad de PPII	35
6.1.4 Prueba de Bradford.....	35

6.1.5. Ensayo de la actividad enzimática de la PPII	36
6.1.6 Cuantificación del producto de la reacción en Nano-drop/fotómetro de fluorescencia, y cálculo de la actividad específica de la PPII	36
6.1.7 Caracterización de tanicitos por inmunocitoquímica acoplada a inmunofluorescencia.	37
6.1.8 Extracción y cuantificación de ARNs mensajeros	38
6.1.9 Cuantificación de ARN específico por reacción de transcriptasa reversa y amplificación en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	39
6.1.10 Electroforesis en gel de agarosa y cuantificación de los productos de la reacción de RT-PCR.....	42
7.0 Resultados	43
7.1 Cultivos primarios	43
7.1.1 Inmunofluorescencia	43
7.1.2 Western blot.....	44
7.1.3 Actividad enzimática de PPII en cultivos primarios empleando TRH-MCA como sust...44	
7.2 Caracterización de cultivos organotípicos de eminencia media de rata	47
7.2.1 Inmunofluorescencia	47
7.2.2 Actividad enzimática	49
7.2.3 Efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la PPII en cultivos organotípicos50	
7.2.4 Extracción y Cuantificación de los ARNm de PPII y PPII* por RT-PCR:	52
8.0 Discusión.....	55
8.1 Cultivo primario	56
8.2 Cultivo organotípico	59
9.0 Conclusiones	64
9.1 Perspectivas.....	65

Abreviaturas

AgRP: péptido relacionado a la proteína agutí

BAT: tejido adiposo pardo

CART: péptido relacionado a la cocaína y anfetamina

CCK: colecitoquinina

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

D1/2: desyodasas 1/2

DARPP-32: dopamine and cyclic AMP - regulated phosphoprotein of 32 kDa

GFAP: proteína glial fibrilar ácida

GLP1: Péptido similar al glucagón 1

HPT: Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides

LCR: líquido cefalorraquídeo

LHA: área hipotalámica lateral

NPY: neuropéptido Y

PFA: área preforical

POMC: Poopiomelanocortina

PPII: piroglutamil peptidasa II

PVN: núcleo paraventricular

SNC: sistema nervioso central

TH: hormonas tiroideas

TRH: hormona liberadora de tiotropina

TSH: tiotropina

UCP1: Proteína desacopladora 1

α -MSH: hormona estimulante de melanocitos

1.0 Resumen

Los tanicitos son un tipo de glía radial presente en la base media del hipotálamo, en las paredes del tercer ventrículo. Participan en distintos procesos como la neurogénesis, funciones de barrera, y regulación del eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroideas (HPT). Dicho eje mantiene la concentración de hormonas tiroideas en sangre, y como consecuencia la regulación del balance energético corporal. Los tanicitos presentes en la eminencia media expresan a la piroglutamil peptidasa II (PPII), una ectoenzima capaz de hidrolizar a la hormona liberadora tirotrópica (TRH). Se ha propuesto como función de la PPII reducir la cantidad de TRH que se libera al sistema porta-hipofisiario en situaciones como el ayuno, o bajo la administración sistémica de hormonas tiroideas, puesto que su expresión y actividad incrementan bajo dichas condiciones. Se propuso como objetivo identificar los reguladores de la expresión y actividad de la PPII por la importancia que esto pueda tener sobre el eje HPT. Inesperadamente, no se pudo detectar la actividad enzimática *in vitro*, en cultivos de eminencia media de rata de 10 días, posiblemente debido a la sobre expresión de la PPII*, una isoforma dominante negativa de la PPII. En el presente trabajo, se probaron condiciones de cultivo primario arrestados en medio sin suero, y cultivos organotípicos de eminencia media con el fin de obtener un sistema que permita estudiar la expresión y actividad de la PPII. Ésta fue detectable únicamente en los cultivos organotípicos. Un análisis de las cinéticas de expresión de los ARNm de PPII y de la actividad enzimática sugiere que los tanicitos transcriben activamente al gen de la PPII en el cultivo organotípico, sin alterar su patrón de splicing alternativo. Pruebas inmunohistoquímicas confirmaron la presencia de tanicitos. Finalmente, en cultivos organotípicos se observó que la actividad de la PPII está correlacionada positivamente con la concentración de hormonas tiroideas. Se concluye que los cultivos organotípicos de eminencia media son un buen modelo para estudiar los reguladores de la PPII *ex vivo*.

2.0 Introducción

2.1 Balance energético corporal

El balance energético es el proceso por el cual el cuerpo mantiene las reservas energéticas a lo largo del tiempo, equilibrando la ingesta y el gasto energético (Morton, Meek, & Schwartz, 2014). El mantenimiento de dichas reservas implica cambios constantes en la actividad metabólica. Cuando se ingieren alimentos, las reservas energéticas se almacenan inmediatamente en forma de glucógeno en el hígado y músculo esquelético, o en forma de triglicéridos en los adipocitos. A dicho ensamblaje de macromoléculas se le denomina anabolismo. Por el contrario, cuando se requiere liberar energía (por ejemplo, en situaciones de ayuno, durante el ejercicio o una respuesta inmune), ésta es provista por la glucosa, los ácidos grasos y las cetonas (para todo tipo de células, excepto las neuronas), provenientes de los triglicéridos y el glucógeno, proceso que se denomina catabolismo (Bear, Connors and Paradiso, 2007).

Para mantener este sistema en equilibrio es necesaria la regulación del comportamiento alimenticio, así como del gasto energético, que se da por la interacción entre el sistema nervioso central (SNC), en particular el hipotálamo, y los tejidos periféricos involucrados en el censo del estado energético corporal (Martins et al., 2016). Las señales de entrada al sistema nervioso central pueden ser aferencias nerviosas o de carácter hormonal o nutricional, ya que el hipotálamo y otras zonas del SNC contienen receptores que reconocen estas señales que son el reflejo del estado energético. Como señales a largo plazo se han reconocido a la leptina e insulina, liberadas a la circulación por el tejido adiposo blanco y páncreas, respectivamente, y de corto plazo se ha reconocido a la colecistoquinina (CCK) y el péptido similar al glucagón-1 (GLP1) generados en el intestino, así como a la glucosa y los ácidos grasos liberados del hígado al torrente sanguíneo (Morton et al., 2014) o la ghrelina liberada cuando el estómago este vacío (fig.1). Éstas últimas señales dependen de los alimentos consumidos en el momento y están relacionadas con la sensación de saciedad (Schwartz *et al*, 2000)

La señalización por leptina e insulina está en relación directa con el grado de adiposidad; regulan la ingesta alimenticia/gasto energético por medio de receptores localizados en el sistema nervioso central y en particular en el núcleo arcuato del hipotálamo (Schwartz *et al.*, 2000).

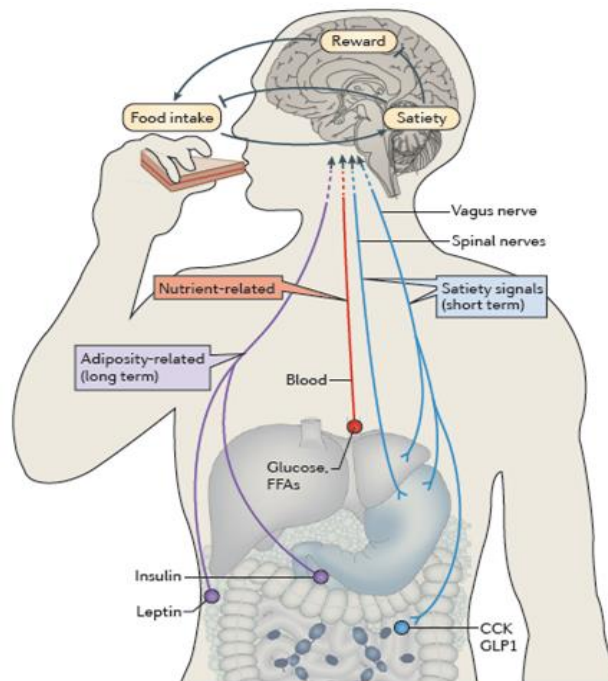


Figura 1. Regulación de la homeostasis energética en el sistema nervioso central. El sistema nervioso central integra las señales de entrada del estado de las reservas energéticas a largo plazo (como la leptina) y a corto plazo, relacionadas con los alimentos ingeridos y señales del intestino. Esto permite regular la ingesta alimenticia y el gasto energético para mantener las reservas energéticas en equilibrio a lo largo del tiempo. CCK, colecistoquinina; FFAs, ácidos grasos libres; GLP1, péptido 1 similar al glucagón; Tomado de (Morton *et al.*, 2014)

En función de los niveles de leptina e insulina circulantes, en el núcleo arcuato del hipotálamo se activan o inhiben dos tipos de neuronas que expresan distintos neuropéptidos con actividad antagonista: los orexigénicos, como el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado a la proteína agutí (AgRP), que inhiben el gasto energético e inducen la ingesta de alimento y los anorexigénicos, que inhiben la ingesta de alimento y activan el catabolismo, como la hormona estimulante de melanocitos (α -MSH) péptido generado a partir del precursor de proopiomelanocortina o POMC y el péptido relacionado a la cocaína y anfetamina (CART) (López, Alvarez, Nogueiras, & Diéguez, 2013; Schwartz *et al.*, 2000). A las neuronas que

sintetizan estos péptidos se les denomina de primer orden y a su vez proyectan sus axones hacia neuronas denominadas de segundo orden presentes en distintos núcleos hipotalámicos, como el núcleo paraventricular (PVN), el área hipotalámica lateral (LHA) y área preformical (PFA), así como núcleos extrahipotalámicos. El PVN es de gran importancia en parte porque contiene poblaciones neuronales que sintetizan y liberan a la hormona liberadora de corticotropina (CRH), oxitocina, vasopresina y a la hormona liberadora de tirotropina (TRH) (Schwartz et al., 2000).

Entre esta última población de neuronas, se encuentran las denominadas neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas que proyectan sus axones hacia la eminencia media, donde liberan TRH hacia la hipófisis anterior y tienen como función encender o apagar el eje Hipotálamo-pituitaria-tiroides (HPT) según las condiciones cambiantes del medio (Fekete & Lechan, 2014).

2.2 La Hormona Liberadora de Tirotropina y el eje HPT

La estructura de la hormona liberadora de tirotropina se identificó en 1969 por los grupos de Schally y Guillemin (ver en Joseph-bravo, Jaimes-hoy, & Charli, 2015). Se trata de un tripéptido compuesto por pGlu-His-ProNH₂, que induce la síntesis y liberación de la tirotropina (TSH) de los tirótrofos de la adenohipófisis, como su nombre lo indica (Fekete & Lechan, 2014). Una vez liberada, la TSH es conducida a la glándula tiroides, en donde promueve la síntesis y liberación de hormonas tiroideas, principalmente de T4. Finalmente, las hormonas tiroideas (TH) son transportadas a través del torrente sanguíneo por moléculas como la albúmina o la globulina hacia los tejidos blanco (Joseph-Bravo *et al.*, 2015). En conjunto, este circuito se conoce como eje Hipotálamo-Pituitaria-Tiroides (HPT) y tiene como función primaria mantener los niveles de hormonas tiroideas en la circulación. Una vez en los tejidos blanco, la hormona tetrayodotironina, tiroxina o T4, es desyodada por las desyodasas 1 o 2 (D1 y D2), produciendo una forma cien veces más afín a los receptores para hormonas tiroideas, la hormona triyodotironina o T3 (Joseph-Bravo et al., 2015; López et al., 2013). Las TH cumplen funciones esenciales para el desarrollo del cerebro, el funcionamiento de tejidos como el cardiovascular, el óseo y el hepático, además de participar

en la regulación de la ingesta de alimento y el gasto energético (Fekete & Lechan, 2014; López *et al.*, 2013). Algunos de los procesos regulados por las TH e involucrados en el balance energético son la termogénesis en el tejido adiposo pardo (BAT) y músculo o la lipólisis en el tejido adiposo blanco.

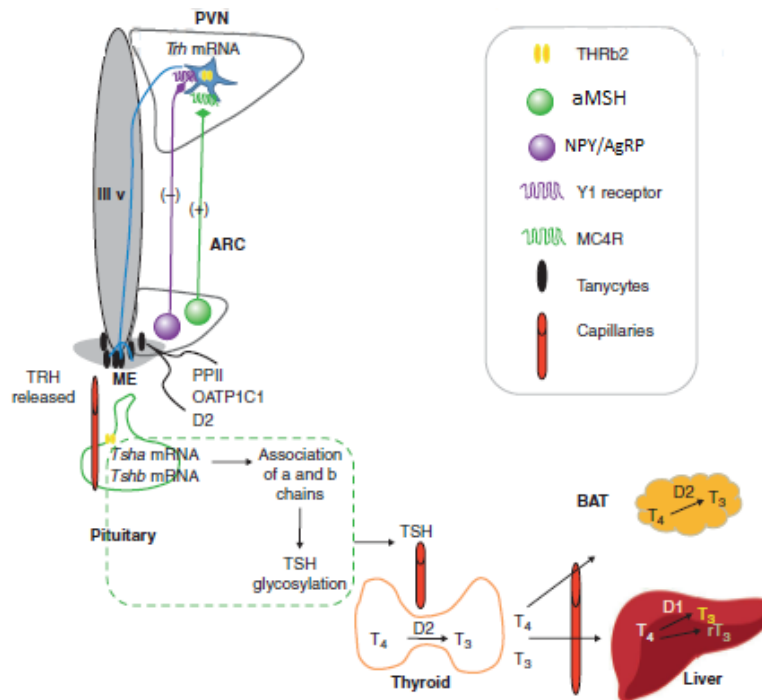


Figura 2. Funcionamiento del eje HPT y sus elementos participantes. Según el estado nutricional, las poblaciones de neuronas del núcleo arcuato activan (POMC/αMSH) o inhiben (NPY/AgRP) la síntesis de TRH en el PVN. Éste es liberado en la eminencia media hacia los vasos del sistema porta-capilar. La cantidad de TRH liberado es regulada por la PPII presente en los tanocitos de la eminencia media. La TRH promueve la liberación y síntesis de TSH en la pituitaria y la TSH de las hormonas tiroideas en la tiroides. Finalmente, éstas llevan a cabo múltiples funciones en sus órganos blanco y una retroalimentación negativa en el PVN. HPT, Hipotálamo Pituitaria Tiroides; TRH, hormona liberadora de tirotrópina; TSH, tirotrópina; PVN, núcleo paraventricular; ME, eminencia media; PPII, piroglutamil peptidasa II; D2, desyodasa 2. Tomada de Joseph-Bravo *et al.*, 2015.

La termogénesis se refiere a la conservación o producción de calor con el fin de mantener la temperatura corporal. En el músculo, las TH modifican los gradientes iónicos mientras estimulan la activación de las ATPasas, proceso que requiere ATP y que como resultado produce calor. En el tejido adiposo pardo, la liberación de calor resulta del regreso de protones a la matriz mitocondrial por la acción de la proteína desacopladora 1(UCP1), una vía alterna a la ATPasa (López et al., 2013).

El efecto pleiotrópico que tienen las TH en la adipogénesis, metabolismo de lípidos, termogénesis etc. revela la importancia metabólica de la interacción entre la glándula tiroidea y el tejido adiposo. Un mal funcionamiento del eje tiroideo puede conducir a hipertiroidismo o hipotiroidismo, los cuales se asocian a varios tipos de desórdenes incluyendo alteraciones del peso corporal (en el caso del hipotiroidismo, una ganancia de peso por acumulación de grasa a falta de la activación del metabolismo basal y retención de agua, y en el caso del hipertiroidismo, una pérdida de peso y masa corporal debido a un incremento del gasto energético, a pesar de un incremento en el apetito). A su vez, la obesidad se ha asociado con el incremento de riesgo de desarrollar diabetes tipo 2, alergias, enfermedades autoinmunes o distintos tipos de cáncer (Santini et al., 2014).

Las TH también juegan un papel importante/relevante a nivel del sistema nervioso central, en donde se expresan sus receptores y transportadores (TR, MCT8), particularmente en los núcleos relacionados con la regulación del balance energético corporal (como el núcleo del arco o paraventricular del hipotálamo) (López *et al.*, 2013). Como se mencionó anteriormente, una de las funciones de las TH a nivel del sistema nervioso central es la de disminuir la expresión y liberación de TRH en las neuronas del PVN, por lo cual se dice que ejercen una retroalimentación negativa del eje HPT hipotálamo (Joseph-Bravo et al., 2015). Sin embargo, éste no es el único punto de regulación sobre el eje HPT. En los tanicitos, un tipo de células gliales, se expresa una serie de proteínas clave como la D2, la cual mantiene la concentración local de T3, así como a la PPII, la piroglutamil peptidasa II, una ectoenzima capaz de hidrolizar a la TRH (Sanchez *et al.*, 2009).

2.3 Participación de los tanicitos en la regulación del balance energético

Los tanicitos son células gliales, similares a la glía radial, que contribuyen a formar la pared de los ventrículos cerebrales en regiones específicas del SNC (Pilz *et al.*, 2013). Están presentes en los órganos circunventriculares, como la eminencia media o el órgano vasculoso de la lámina terminalis, zonas caracterizadas por contener células con propiedades proliferativas (Bennett *et al.*, 2009). En la rata, los tanicitos hipotalámicos se forman durante los últimos días de gestación (E 19) y durante las dos primeras semanas de vida post natal. Proviene de la glía radial local, que posiblemente provenga de la misma zona neurogénica ventricular que da origen al hipotálamo (Altman & Bayer, 1978; Goodman & Hajihosseini, 2015). La maduración morfológica y funcional se alcanza durante el primer mes de vida post natal, aunque varía en función del subtipo de tanicito. No se aprecia dimorfismo sexual entre tanicitos de ratas hembra y macho, como lo indica Walsh *et al.* (1978) a los días 1, 5 y 10 (según Rodríguez *et al.*, 2005). Los tanicitos juegan distintos papeles fisiológicos, desde propiedades de barrera y difusión selectiva entre el parénquima hipotalámico, la sangre y el líquido cefalorraquídeo (LCR) (haciendo el papel de sensores de los niveles de glucosa) (Orellana *et al.*, 2012), funciones neuroendócrinas, regulando la actividad de las neuronas hipotalámicas (Prevot *et al.*, 1999), el balance energético (Bolborea *et al.*, 2015), y funciones neurogénicas, actuando como progenitores celulares (Lee *et al.*, 2012).

En particular, su participación en la regulación del balance energético corporal deriva de su proximidad y conexión con los núcleos hipotalámicos que participan en la homeostasis energética. Son conductores de la leptina proveniente del torrente sanguíneo hacia el hipotálamo medio basal (HBM), a través de la EM y el LCR (Balland *et al.*, 2014), y participan fuertemente en la regulación del eje HPT. Esto último por medio de la captura de T4 (por medio de receptores MCT8 y OATP1); su conversión a T3 (por la D2) que será conducida de manera retrógrada al PVN, o a una forma inactiva (por la D3); y finalmente, por la degradación de la TRH, de lo cual se hablará más adelante (Fekete & Lechan, 2014).

Los tanicitos, localizados en la parte ventral del hipotálamo medio se clasifican -según su localización, morfología, citoquímica y ultraestructura- en $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ y $\beta 2$ (Goodman &

Hajihosseini, 2015), y más recientemente en γ (Wittmann *et al.*, 2016). Se caracterizan por tener un cuerpo pequeño y largas proyecciones, similares a los fibroblastos, mismo que los diferencia de las células endociliales (Goodman & Hajihosseini, 2015). Los tancitos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ se encuentran en las paredes ventrolaterales del tercer ventrículo y proyectan hacia los núcleos dorsomedial y ventromedial y hacia el núcleo del arcuato, respectivamente. Los tancitos $\beta 1$ se localizan en la base y sus extensiones laterales proyectan hacia los extremos laterales de la eminencia media, mientras que los $\beta 2$ proyectan hacia la zona medial externa de la eminencia media, en donde se encuentran los capilares portales (Peruzzo *et al.*, 2000). Los tancitos γ se localizan principalmente en el tallo infundibular y sus procesos a menudo terminan en los capilares. Comparten características morfológicas (proceso alargado) y ultraestructurales con los tancitos β ; sin embargo, se han descrito como células no endociliales, sino astrocíticas, pues pueden presentar un cuerpo pequeño y múltiples procesos (Wittmann *et al.*, 2016).

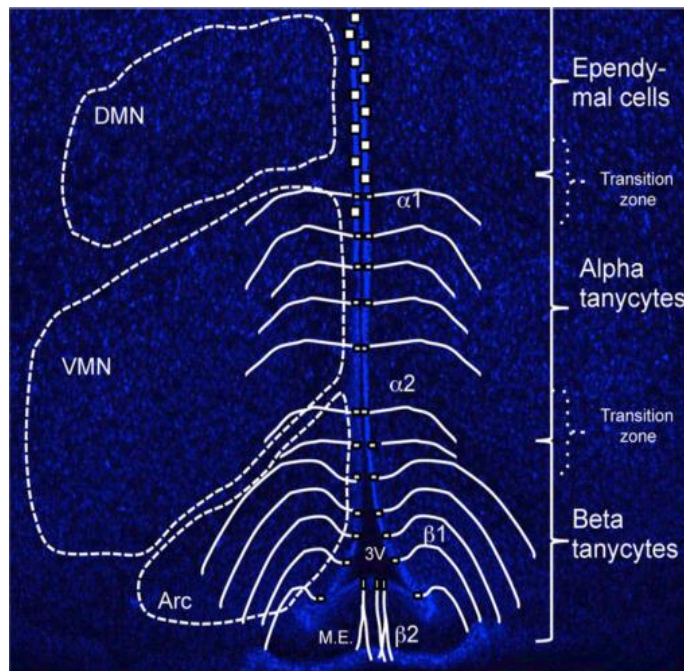


Figura 3. Organización y distribución de los tancitos hipotalámicos. Se observa la distribución de los distintos subtipos de tancitos y la dirección de sus proyecciones en relación con los núcleos hipotalámicos. Se distribuyen a lo largo de las paredes del tercer ventrículo de manera regionalizada, distinguiendo los tancitos α y β . No se aprecia en esta imagen el tallo infundibular, en donde se localizan los tancitos γ . ME, eminencia media; Arc, núcleo del arcuato; VMN, núcleo ventromedial; DMN, núcleo dorsomedial. Tomada de Goodman and Hajihosseini, 2015.

La eminencia media - dorsalmente bañada por el líquido cefalorraquídeo, ventralmente expuesta al espacio perivascular de los capilares del sistema porta y al espacio subaracnoideo y lateralmente en contacto con regiones hipotalámicas (como el núcleo del arcuato)- es una de las “ventanas” del cerebro, regiones libres de barrera hematoencefálica, que permiten el paso de hormonas hacia la circulación, y la detección de señales provenientes del plasma por parte de los tejidos cerebrales. Debido a esto, los tanicitos han sido sugeridos como mediadores entre el líquido cefalorraquídeo y la circulación del sistema porta-hipofisiario (Peruzzo *et al.*, 2000). Algunas de las características de los tanicitos que confirman dichas funciones son la presencia de endosomas tempranos y tardíos (N-caderina y Caveolina 1) y la presencia de Rab4 (relacionada con el transporte vesicular) (Goodman & Hajihosseini, 2015; Rodríguez *et al.*, 2005). Además, mantienen una zona delimitada por uniones estrechas u ocluyentes y zona adherente. Esto permite el transporte de neurohormonas hacia la circulación por medio de transporte axonal (celular) pero no su regreso por difusión hacia el LCR o el espacio intercelular de las regiones vecinas como el núcleo arcuato (Peruzzo *et al.*, 2000).

Algunos de los marcadores que caracterizan a los tanicitos son la proteína DARPP-32 (dopamine and cyclic AMP-regulated phosphoprotein of 32 kDa), la cual disminuye hasta un 70% conforme avanza la edad del organismo (Peruzzo *et al.*, 2000; Goodman & Hajihosseini, 2015), la vimentina (proteína de citoesqueleto), el transportador de glucosa GLUT-1, Rax (necesaria para su desarrollo), desyodasa 2, algunos receptores y factores de crecimiento etc. En particular, algunos marcadores como la GFAP (proteína glial fibrilar ácida) o S-100 (proteína de unión a calcio) permiten distinguir a las células endodiales de los tanicitos, mientras que otros como nestina y la PPII permiten una distinción más específica de los tanicitos β (Goodman and Hajihosseini, 2015; Peruzzo *et al.*, 2000).

La tabla 1 muestra alguno de los marcadores y su rango de distribución.

TABLE 1 | Common and domain-restricted gene expression within the cell lining of the adult third ventricle.

Gene/Marker	β tanocytes	α tanocytes	Ependymal cells	Parenchymal cells	Reference/s	CreERT2 source
Sox2					Haan et al., 2013	Jackson Laboratories
Vimentin					Allen Brain Atlas	
GLUT1					Peruzzo et al., 2000; Allen Brain Atlas	
Fgf Receptor 1					Allen Brain Atlas	
Fgf Receptor 2					Belluardo et al., 1997	
BLBP					Haan et al., 2013	
CNTFR					Kokoeva et al., 2005	
Fgf10					Hajihosseini et al., 2008	Haan et al., 2013
Nestin					Wei et al., 2002; Bennett et al., 2009	Jackson Laboratories
GPR50					Batailler et al., 2012; Salvatierra et al., 2014	
DARPP-32					Fekete et al., 2000	
UGS148					Ma et al., 2015	
PPII					Sanchez et al., 2009	

Tabla 1. Algunos de los marcadores específicos de tanicitos y células ependimales. Para algunos genes es posible ver, mostrado como un gradiente de color amarillo, la localización de su expresión. Posiblemente esto se deba a las zonas de transición de dominios celulares. Tomada y modificada de (Goodman & Hajihosseini, 2015).

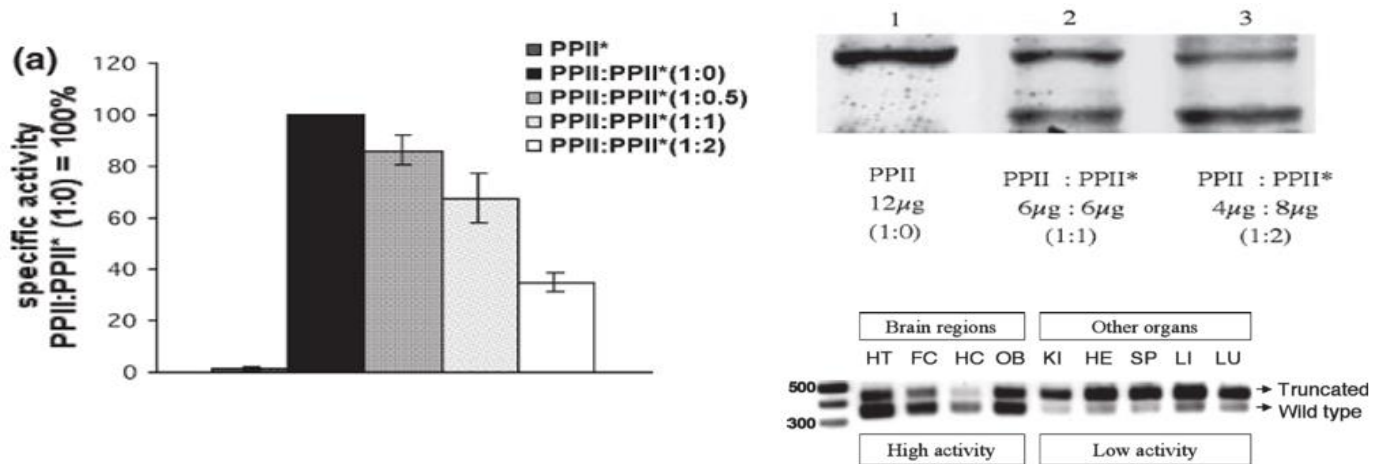
2.4 La piroglutamil peptidasa II

La ectoenzima piroglutamil peptidasa II se encuentra distribuida preferentemente en el sistema nervioso central, con mayor actividad en el bulbo olfatorio, hipocampo y corteza, seguidos por el hipotálamo y en menor medida en el tallo cerebral (Heuer *et al.*, 1998; Vargas *et al.* 1992). A pesar de que no es la única enzima capaz de hidrolizar a la TRH *in vitro* (pues existe una enzima citosólica denominada piroglutamil peptidasa I, distinta a la forma soluble de la PPII, que es inespecífica porque hidroliza muchos substratos *in vitro* y se presenta en todos los tejidos), la PPII muestra gran especificidad por la TRH -su único substrato biológico conocido- lo cual sugiere que sus funciones sean altamente especializadas (Sánchez, Charli, & Lechan, 2013).

La PPII es una proteína de 1025 aminoácidos (Schauder *et al.*, 1994) con estructura primaria compuesta por un dominio N-terminal intracelular, una región trans-membranal y un dominio C-terminal extracelular que contiene motivos de exopeptidasa y catalíticos que permiten la hidrólisis de la TRH. Pertenece a la familia M1 de las metaloproteasas (Schauder *et al.*, 1994), por lo cual requiere de un ion zinc para su funcionamiento y es inhibida por la O-fenantrolina, que aísla al zinc. Está compuesta por dos subunidades idénticas y tiene una

masa de 230kDa, una vez solubilizada con la tripsina. La especificidad tan estrecha de la PPII y distinta de la de otras enzimas de la familia M1 de aminopeptidasas se explica en parte por la presencia de dos aminoácidos de la región catalítica que facilitan la interacción con el piroglutamil, por medio de la formación de puentes de hidrógeno (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006). Tal como ocurre para otras ectopeptidasas, varias evidencias indican que la PPII limita la duración e intensidad de la acción de la TRH. Los productos de la acción de la PPII sobre la TRH son el piroglutámico y el His-Pro-NH₂, productos incapaces de unirse a los receptores de TRH (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2006; Sánchez *et al.*, 2013).

Además, se ha detectado una isoforma de la PPII producida a partir del mismo ARNm primario que la PPII completa y activa, pero por medio de un procesamiento alternativo. Dicho ARN codifica para una forma de PPII más corta que carece de una parte del dominio C-terminal: se le denomina PPII truncada o PPII* (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005). La PPII* es una isoforma dominante-negativa que reduce de manera dosis-dependiente la actividad de la PPII, por lo que se sugiere que juega un papel en la regulación de la actividad de dicha enzima (Chávez-Gutiérrez *et al.*, 2005).



A

B

Figura 4. Actividad de la PPII* como dominante negativa de la PPII completa. A) La PPII inhibe de manera dosis dependiente la actividad específica de la PPII en células co-transfectadas con los plásmidos correspondientes. B) Western blot de la relación del nivel de proteína PPII y PPII* en células COS transformadas con diferente proporción de cada uno de los plásmidos (carriles superiores del panel B) y en

diferentes regiones del cerebro y órganos que presentan alta o baja actividad enzimática (carriles inferiores del panel B). HT, hipotálamo; FC, corteza frontal; HC, hipocampo; OB, bulbo olfatorio; KI, riñón; HE, corazón; SP, bazo; LI, hígado; LU, pulmones. Figuras tomadas de Chávez-Gutiérrez et al., 2005.

Una de las principales razones que nos permite proponer la importante participación de la PPII en la regulación de la TRH en el eje HPT es su localización anatómica. Como se mencionó anteriormente, la PPII se localiza en distintos tejidos cerebrales; sin embargo, genera interés su alta expresión en la eminencia media. En la eminencia media se ha analizado la relación espacial entre la terminación de los procesos de los tanicitos $\beta 2$ (en donde se expresa la PPII) y las terminaciones de los axones de las neuronas que expresan TRH. Estas dos regiones se co-localizan en la zona de transición de la eminencia media y la entrada al sistema porta, en donde se encuentran los capilares portales (Sanchez *et al.*, 2009). En el mismo trabajo se demostró que existe una regulación positiva de la expresión y actividad de la PPII por parte de la hormona tiroidea T3, así como una amplificación del incremento de los niveles de TSH circulantes al inyectar por vía intraperitoneal un inhibidor de la PPII en animales expuestos a un estímulo de la actividad de las neuronas de TRH como el frío. Otro de los trabajos realizados recientemente para comprender el papel que juega la PPII en la inactivación de la TRH, fue el realizado por el Dr. Iván Lazcano (Lazcano *et al.*, 2015), en donde demuestra que la PPII es regulada positivamente en la eminencia media durante el ayuno, lo que sugiere que participa así en la disminución de la cantidad de TRH entrante al sistema porta y, por lo tanto, regulando negativamente al eje HPT.

Estos datos están en acorde con la regulación fisiológica del eje, el cual, en general, está activo cuando el estado energético es positivo, y en situaciones de demanda energética como el ejercicio (sin un estrés previo o un ayuno) y apagado cuando el balance energético es negativo como durante el ayuno, restricción alimenticia o infecciones, o bajo situaciones de estrés crónico, inflamación, administración crónica de hormonas tiroideas etc. (Fekete & Lechan, 2014; Joseph-Bravo *et al.*, 2015).

2.5 Cultivos de tanicitos

Debido al gran interés que proporciona la extensa participación de los tanicitos en las diversas funciones fisiológicas mencionadas anteriormente, algunos grupos de trabajo comenzaron a optimizar cultivos primarios de estos tipos celulares, pues el cultivo de células provee un modelo básico para estudiar sistemas complejos difíciles de entender *in vivo*, como es el caso del ambiente que rodea a los tanicitos (Gabrion *et al.*, 1998). El medio empleado para cultivo por lo general incluye suero, el cual sirve como fuente de factores de crecimiento (Cooper & Hausman, 2013). Los cultivos pueden ser primarios, éstos se obtienen a partir de la disociación de un tejido y las células se dividen un número finito de veces antes de morir (50-100 pases); las líneas celulares son aquellas llamadas inmortales, y los cultivos organotípicos son aquellos en los que se mantienen las propiedades estructurales del tejido (Cooper & Hausman, 2013).

Desde 1988 se establecieron cultivos primarios de hipotálamo fetal de rata y ratón sembrados en medios con suero o definidos químicamente (Gabrion *et al.*, 1988). En estos cultivos se pudo definir morfológicamente la presencia de tanicitos, pero en minoría con relación al resto de los ependimocitos. En 1996, con el fin de explorar su papel neurotrófico, el grupo de Chauvet cultivó tanicitos provenientes de ratas de 10 días post natales. El tejido se trató con colagenasa y posteriormente con tripsina-EDTA. El cultivo se mantuvo durante dos semanas en medio DMEM/F12 con suero fetal bovino al 10%. Del mismo modo, en el trabajo de Prevot (Prevot *et al.*, 2003) se mostró que los tanicitos regulan la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante por medio de la fosforilación de los receptores erbB que responden a TGF α , y liberan PGE2 (prostaglandina E2). Sin embargo, al alcanzar la confluencia celular se hizo un cambio a medio desprovisto de suero y suplementado (glutamina, HEPES, insulina y putrescina). Siguiendo el protocolo de Prevot, Seranno *et al.* (2004), mostraron que las células endoteliales de la EM inducen por medio de la acción del óxido nítrico un reacomodo del citoesqueleto de las células ependimogliales. Más recientemente, el grupo de Perelló ha trabajado con cultivos primarios de tanicitos y los ha caracterizado por distintos métodos inmunohistoquímicos, electrofisiológicos, morfológicos

etc. (De Francesco et al., 2017). A diferencia de los cultivos anteriores, estos últimos se realizaron desde el inicio en un medio sin suero suplementado con BSA, gentamicina, transferrina, insulina y adicionado al cuarto día con trombina.

Además de estos trabajos, otros autores establecieron cultivos organotípicos. En 1973 se establecieron cultivos organotípicos de eminencia media completa con el fin de estudiar la capacidad endocítica de los tanicitos (Silverma et al., 1973). Patrik N. Stoney y colaboradores presentaron en 2015 un cultivo organotípico de hipotálamo que realizaron con el fin de explorar la acción del ácido retinoico como posible mediador del efecto de las hormonas tiroideas en la regulación génica en el hipotálamo. Se concluyó que las TH incrementan la expresión de las enzimas responsables de la síntesis del ácido retinoico, el cual tiene el potencial de inducir la expresión de varios genes asociados al crecimiento y apetito de la rata. Su trabajo fue inspirado por el trabajo de House S. B. *et al.* (1998), cuyo fin fue probar que un cultivo organotípico hipotalámico estático permite la supervivencia de las células, así como una suficiente estabilidad para tomar registros electrofisiológicos y de expresión génica.

A pesar de que se han establecido diversos protocolos para el estudio de las funciones de los tanicitos, el cultivo primario de estos ha resultado difícil en parte por la pequeña cantidad de células que se obtienen al cultivarlos, y la complejidad de su ambiente natural (De Francesco *et al.*, 2017). Los cultivos sembrados en medio con suero han permitidos estudiar algunas de las características (principalmente morfológicas) de los tanicitos; sin embargo, la transición a medios sin suero permitió obtener cultivos con un mayor número de tanicitos, con un grado de diferenciación mayor, caracterizados morfológicamente y por electrofisiología (De Francesco *et al.*, 2017). El uso de un medio sin suero parece entonces más adecuado para el estudio de las diversas funciones que llevan a cabo los tanicitos. No obstante, no se puede excluir la importancia del ambiente complejo que forma la eminencia media, y la ventaja que representa el uso de cultivos organotípicos. Estos han permitido mantener modelos libres de señales secundarias presentes *in vivo*, facilitar la experimentación (obtención de una n mayor con menos animales, fácil expresión transgénica por medio de virus) y realizar experimentos que en cultivo primario han sido difíciles de implementar (Cho *et al.*, 2007; House *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2016).

2.6 Expresión y actividad de la PPII en la eminencia media *in vivo* y en cultivos primarios de tanicitos

En nuestro grupo de trabajo, nos interesa entender cómo la PPII regula la concentración extracelular de la TRH y, por lo tanto, el eje HPT. Uno de los objetivos es identificar los reguladores fisiológicos de la PPII en tanicitos y los mecanismos involucrados, por lo cual, basados en los trabajos anteriormente mencionados se han realizado cultivos primarios de tanicitos. En particular ha sido de interés estudiar la regulación de la actividad enzimática de la PPII. La actividad enzimática es la capacidad de una enzima para inducir una reacción química determinada, y por lo general se mide de forma indirecta. Se suele medir a lo largo del tiempo los productos de la reacción por métodos colorimétricos o fluorométricos (Berg, Tymoczko & Stryer, 2008). Para calcular la actividad específica de una enzima es necesario conocer la cantidad de proteína presente en nuestra muestra y así relacionarla con la actividad enzimática del ensayo (Berg, Tymoczko & Stryer, 2008). En el caso de la PPII, el rango de sustratos que permiten el ensayo de cinética enzimática es corto, pues deben tener la estructura general pGlu-XY, donde X suele ser un residuo sin carga y Y debe ser Pro, Ala, Trp, Pro-Gly, Pro-NH₂ (TRH), Pro-β-naftilamina (βNA) o Pro-7-amino-4-metil cumarina (MCA) (Chávez-Gutiérrez et al., 2005). Aquellos comúnmente empleados para el análisis de la actividad enzimática son TRH-βNA y TRH-MCA. Estos son reconocidos e hidrolizados en his-proMCA/ βNA por la PPII, dejando un producto cuantificable por espectrometría (βNA y MCA, después de ser hidrolizado en His-Pro + MCA/βNA por la enzima dipeptidil aminopeptidasa IV) (Kelly *et al.*, 1999).

Los trabajos realizados *in vivo* se han hecho a partir de ratas adultas, mientras que los cultivos de tanicitos provienen generalmente de ratas de diez días de nacimiento. Por esto, en el laboratorio se hizo un estudio del nivel de ARNm, proteína y actividad específica de la PPII en EM a lo largo de la ontogenia. La figura 5 muestra el nivel de ARNm de PPII y PPII* en relación con la cantidad de ARNm de ciclofilina en la EM, a lo largo del primer mes de vida post natal y en ratas adultas.

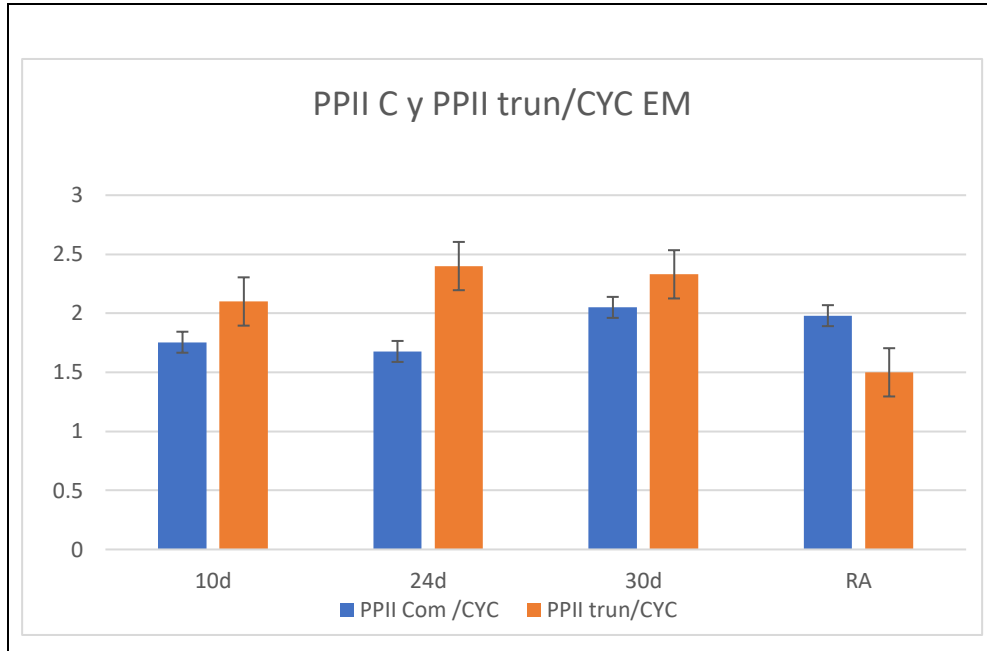


Figura 5. Expresión de la PPII completa y PPII truncada en eminencia media a lo largo del primer mes de vida pn de ratas y en el adulto. Cyc; ciclofilina, empleada como control interno. RA; rata adulta, 10d, 24d y 30d corresponden a los días de vida post natal; (n=4) (Cote-Vélez, no publicado).

Se observó la presencia de ambas isoformas desde los 10 días de vida post natal hasta en la rata adulta.

Para comparar *in vivo* la proporción de proteína de PPII/PPII* se realizó un Western blot. Al igual que para la medición de ARNm, las muestras se tomaron a los 10, 24 y 30 días de vida pn de la rata. En la figura 6, se muestran los resultados obtenidos.

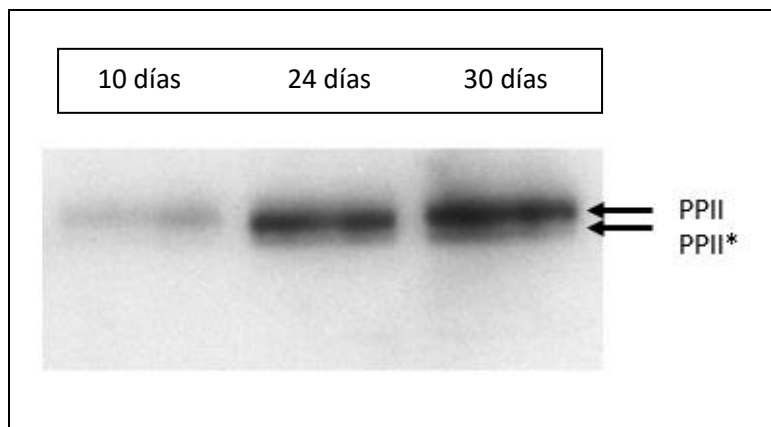


Figura 6. Western blot para PPII y PPII* *in vivo*. Se observa la presencia de la proteína de la PPII de 115 kD por Western blot a los 10 días de vida, 24 y 30 en eminencia media de rata. La banda superior corresponde a la PPII completa mientras que la tenue inferior corresponde a la PPII* (*M. en C. Adair Rodríguez, no publicado*).

Este experimento muestra, al igual que el ARNm, la presencia de ambas proteínas a lo largo del primer mes de vida pn. Sin embargo, la PPII completa se observa con mayor intensidad que la truncada, y parece aumentar con la edad (*M. en C. Adair Rodríguez, no publicado*).

Finalmente, se midió la actividad específica de la PPII en la eminencia media, haciendo una comparación con la actividad que presenta el cerebro completo de un adulto (fig.7).

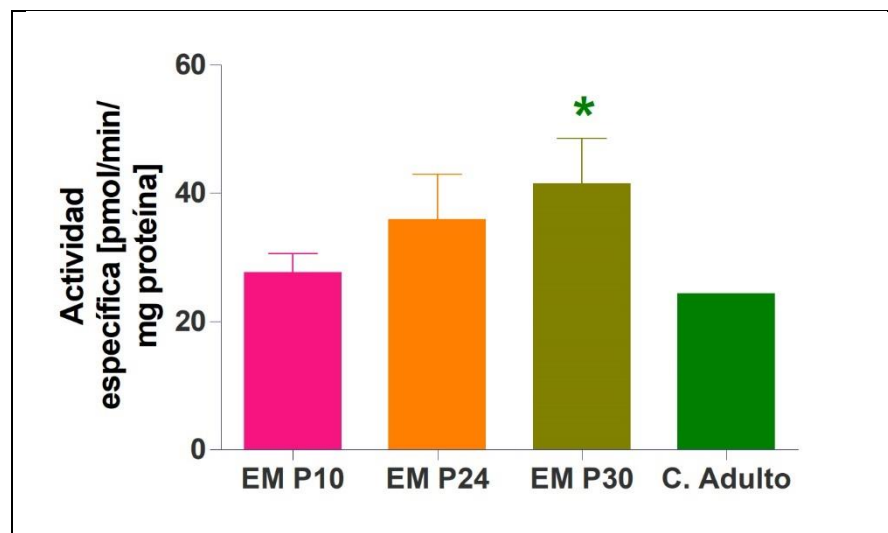


Figura 7. Ontogenia de la actividad específica de la PPII en la eminencia media *in vivo*. Los histogramas corresponden al promedio de las actividades específicas/EM \pm SD en los días 10, 24 y 30 días post natal, y cerebro de rata adulta. La determinación de la actividad en membranas de cerebro de rata adulta corresponde únicamente a un punto, para el resto n=4, *p<0.05 (comparando con P10). EM; eminencia media (*M. en C. Adair Rodríguez, no publicado*).

La actividad es detectable desde los 10 días de nacimiento y se observa un incremento con el tiempo, habiendo una diferencia significativa entre los 10 y 30 días pn. En este último punto,

la actividad enzimática es mayor a la de un cerebro de rata adulta. Los datos de actividad enzimática correlacionan con el nivel de proteína detectado por Western blot.

En resumen, estos datos muestran que en la eminencia media de rata *in vivo*, la PPII completa se expresa en mayor proporción que la PPII*, lo que correlaciona con que la actividad es detectable desde los 10 días postnatales y que aumenta durante el primer mes de vida. El eje HPT está sujeto a diversos cambios durante los primeros días de vida de la rata – se sabe que la retroalimentación negativa por las hormonas tiroideas aparece después de la primera semana postnatal, que el eje no responde todavía al frío y que durante la lactancia los niveles de la TRH incrementan en el hipotálamo- (Fekete & Lechan, 2014). Algunos de estos cambios son la neurogénesis de la EM y del sistema portal hipotálamo-adenohipófisis, el desarrollo de los receptores de TRH en la pituitaria anterior, y de la PPII en el hipotálamo y la pituitaria (Vargas *et al.*, 1992), por lo cual no es de extrañar que su actividad sea detectable en estas etapas tempranas.

Esperando observar algo similar *in vitro*, en nuestro laboratorio se realizaron cultivos primarios de tanicitos en medio suplementado con suero bovino fetal, colectándose muestras con la temporalidad correspondiente a la ontogenia anterior. En estos cultivos se observaron células con una morfología similar a la reportada por De Seranno *et al.* (2004), consistente con la de los tanicitos *in vitro* (Figura 8 A, B). Se analizó, por medio de RT-PCR, los niveles de los ARNm de la PPII, PPII* en muestras tomadas del cultivo y de la D2, la cual se expresa en tanicitos y fue usada como control. Al amplificar el ARNm de la PPII y PPII* se vio mayor cantidad de esta última (Figura 8C). El mensajero de la D2 pudo detectarse en los cultivos (no se muestran datos), lo cual confirma la presencia de tanicitos, pero la diferencia del cociente de los ARNm de la PPII con los datos *in vivo* sugiere una alteración del patrón de procesamiento del ARNm de la PPII.

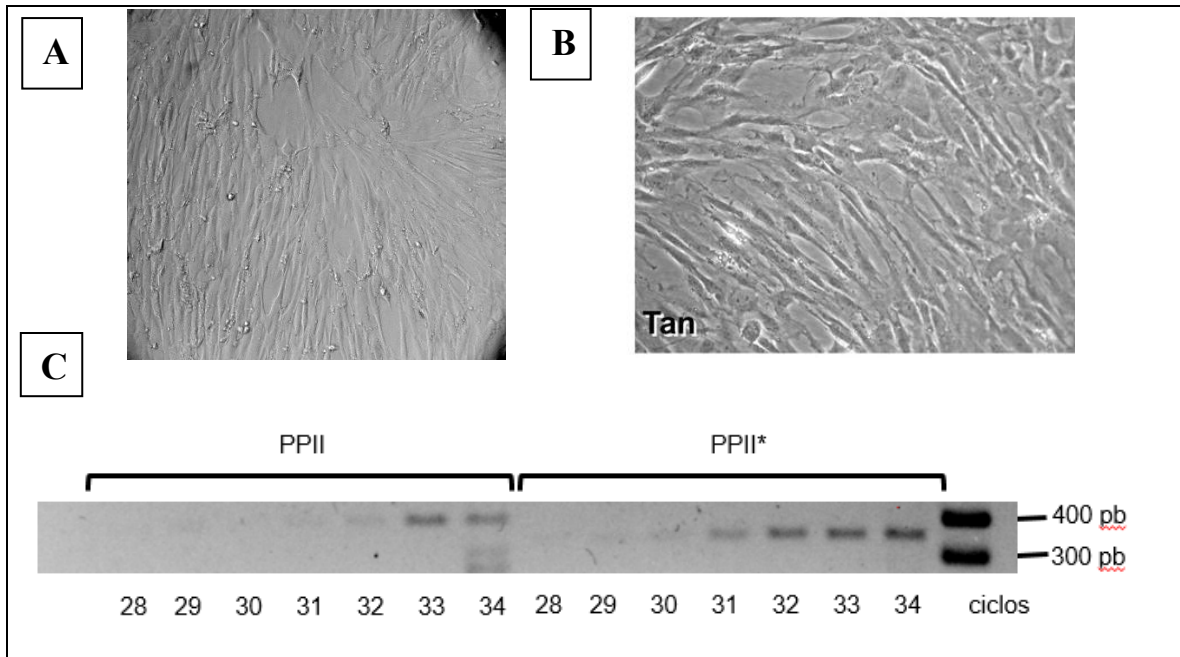


Figura 8. Morfología celular y expresión de la PPII y PPII* en cultivos de tanicitos de eminencia media de rata crecidos en medio con suero. A. Fotografía de cultivos primarios de tanicitos realizados por *M. en C. Adair Rodríguez, Dra. Cote-Vélez*. B Tomada de *De Seranno et al., 2004*. C. Expresión del mensajero de la PPII y PPII*. Se realizaron amplificaciones a diferentes números de ciclos (*M. en C. Adair Rodríguez, Dra. Cote-Vélez*).

Consecuentemente, se realizaron ensayos de actividad enzimática para la PPII tanto en las condiciones basales de cultivo como en cultivos sometidos a distintos tratamientos. Se probó el efecto de la T3, T4 y un medio bajo en glucosa (simulando un ayuno); sin embargo, no se pudo detectar la actividad de la enzima (fig. 9).

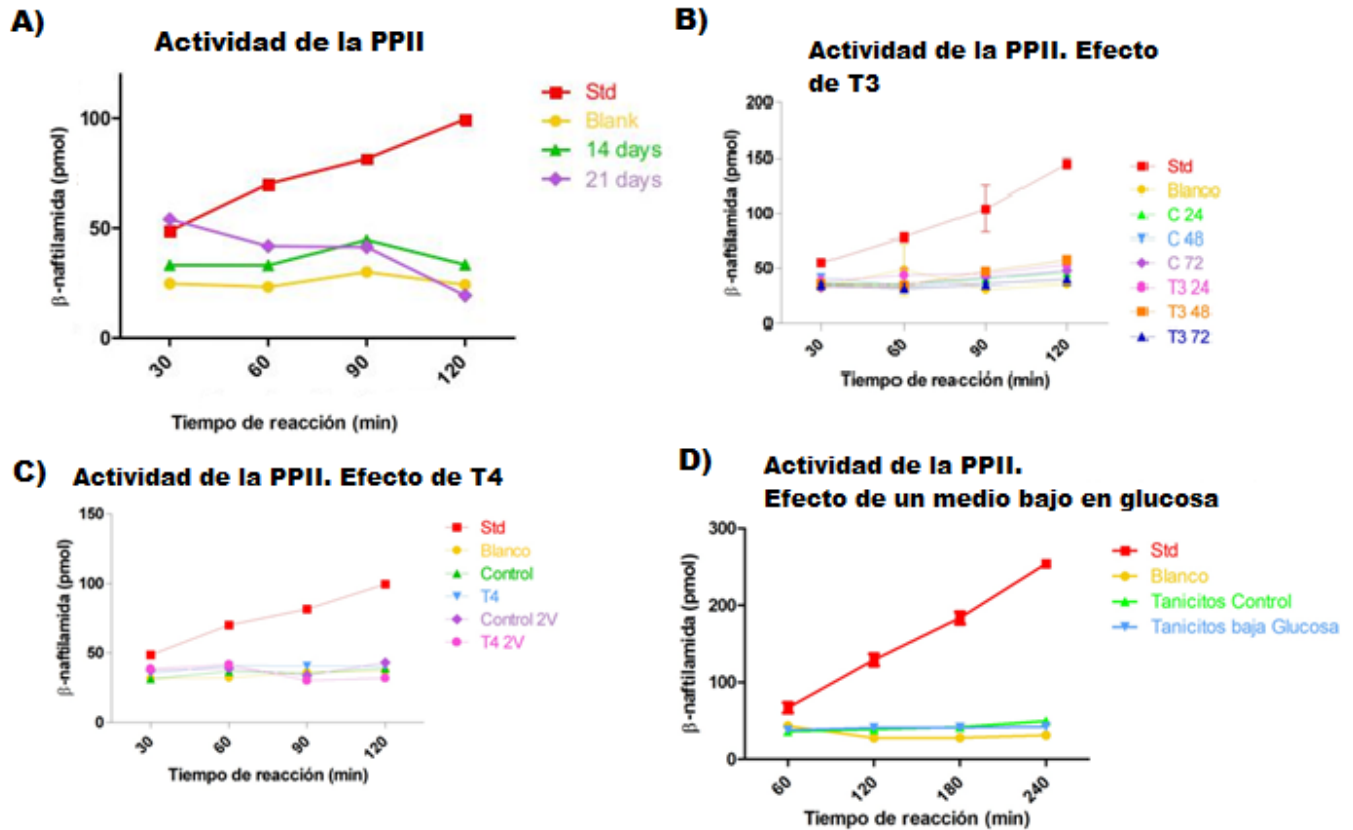


Figura 9. Ausencia de actividad de la PPII en cultivos primarios de tanicitos en medio suplementado con suero. A. Actividad de la PPII en cultivos de 14 y 21 días *in vitro* a concentraciones de glucosa similares a las basales. Efecto de las hormonas tiroideas T3 (B) y T4 (C). D. Efecto de un medio bajo en glucosa, simulando un ayuno. Std, control positivo empleando un homogenizado de membranas de corteza de adulto, Blanco corresponde a un control negativo, es decir un tubo sin fuente de enzima (*M. en C. Adair Rodríguez, no publicado*).

En resumen, los cultivos primarios de tanicitos en medio suplementado con suero permiten la sobrevivencia de tanicitos pero no mostraron actividad de PPII, y una presencia de la PPII* que parece ser mayoritaria de acuerdo a lo observado tras la amplificación por IWPCR. Esto permite postular que la ausencia de actividad está directamente relacionada con la mayor presencia de la PPII* y su actividad como dominante negativa sobre la isoforma completa. Dada la diferencia que se observa con los datos *in vivo*, es posible que el medio de cultivo con suero produzca un cambio en el procesamiento del ARN mensajero de la PPII, favoreciendo la expresión de la PPII*.

3.0 Justificación

Varios antecedentes indican que, en los tanicitos de la eminencia media, la PPII controla por un proceso post-secreción la cantidad de TRH que entra a los vasos portales hipotálamo-hipófisis, y por lo tanto la actividad del eje HPT. Parece entonces importante identificar los circuitos fisiológicos y las vías intracelulares que controlan la actividad de la PPII en la eminencia media, información que permitirá entender de manera más precisa su rol fisiológico.

Para esto, es necesario combinar experimentos *in vivo* con estrategias *in vitro*, con el fin de separar los diferentes elementos celulares y químicos que participan en el control de la actividad de PPII en la eminencia media. Los antecedentes directos sobre la utilidad de los cultivos primarios de tanicitos para estudiar la regulación de la expresión de la PPII muestran complicaciones inesperadas como la presencia mayoritaria de la PPII*, por lo que establecer las condiciones que permitan completar el programa de diferenciación de los tanicitos o el procesamiento adecuado del ARNm de la PPII en dichos cultivos parece relevante para mantener un nivel de actividad de la PPII similar a lo observado *in vivo*.

Para esto se probarán distintas condiciones de cultivo primario y de cultivos organotípicos. Por un lado, se postuló que el uso de medio con suero en los cultivos primarios promueve la proliferación sin una diferenciación suficiente que permita observar el patrón de expresión de la PPII completa, por lo cual se usará un medio sin suero/determinado que induzca un arresto de la proliferación. Por otro lado, si el arresto no permite detectar la actividad enzimática de la PPII, es posible que las interacciones intercelulares sean esenciales para la expresión de la PPII completa, por lo cual se harán cultivos de rebanadas.

4.0 Hipótesis

La optimización del cultivo de tanicitos permitirá detectar la actividad de PPII, y con ello estudiar la regulación de su expresión por hormonas tiroideas.

5.0 Objetivo General

Optimizar las condiciones de cultivos de tanicitos con el fin de estudiar la regulación de la expresión de la piroglutamil peptidasa II por hormonas tiroideas.

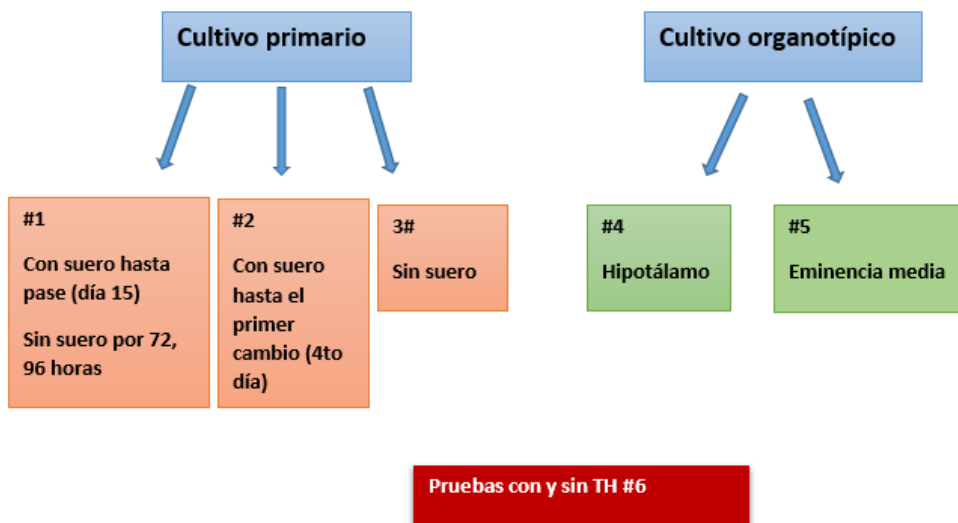
5.1 Objetivos Particulares

1. Confirmar, por medio de inmunohistoquímica, la presencia de tanicitos en los cultivos.
2. Determinar si hay o no actividad enzimática de la piroglutamil peptidasa II en cultivo primario de tanicitos, así como en cultivos organotípicos de eminencia media.
3. Analizar cambios en los niveles de los ARNm de la PPII y PPII* a lo largo de dichos cultivos.
4. Analizar los cambios de actividad específica de PPII en presencia o ausencia de hormonas tiroideas.

6.0 Estrategia experimental

Se probarán dos tipos de cultivos, primarios y organotípicos, ambos provenientes de ratas neonatales de 10 días. Experimentos previos indican que en el cultivo primario sembrado con suero no fue posible detectar actividad de la PPII, por lo que se probará iniciar el cultivo con suero fetal bovino y posteriormente sustituirlo a distintos tiempos por un medio sin suero, adicionado con diversos suplementos. El cambio a un medio sin suero se hizo para frenar la proliferación celular y promover la diferenciación, esperando que se promueva el procesamiento post transcripcional del ARN de la PPII de una forma similar al que se muestra *in vivo*. Los cultivos organotípicos se realizarán con el fin de mantener *in vitro* las conexiones intercelulares para definir si los contactos son importantes en el mantenimiento de la actividad de la PPII en la eminencia media.

En el siguiente diagrama se muestran las condiciones probadas en relación con un número asociado al tipo de cultivo.



6.1 Métodos

6.1.1 Cultivo primario de tanicitos

Se disecó la eminencia media (alrededor de 7 eminencias por caja de 60mm) de ratas Wistar de ambos sexos de 10 días post natal, edad en la que el número de tanicitos es mayor y menor el de astrocitos, (Prevot, 2003, de Chauvet *et al.* 1996) y se cultivaron según los protocolos descritos por Chauvet *at al.*, 1996; Prevot, 2003; De Seranno *et al.*, 2004 y De Franscesco *et al.*, 2017). Todo el procedimiento se realizó dentro de una campana de flujo laminar.

El tejido se depositó en un tubo con Hank's frío (Solución de NaCl 0.136 M, KCl 5.41mM, KH₂PO₄ 0.44mM, NaH₂PO 7.5mM y glucosa 5.55mM). Tras recuperar todas las eminencias medias, se cortaron con tijeras (≈100 cortes) y se dejaron sedimentar por unos minutos. Después de la sedimentación se realizaron tres lavados con Hank's a 37°C. A 1ml de Hank's se le agregaron 2ml de DNAsa-tripsina GIBCO (0.25mg/ml y 0.28mg/ml, respectivamente) preincubado a 37°C con el fin de realizar una digestión enzimática, y se dejó incubar durante

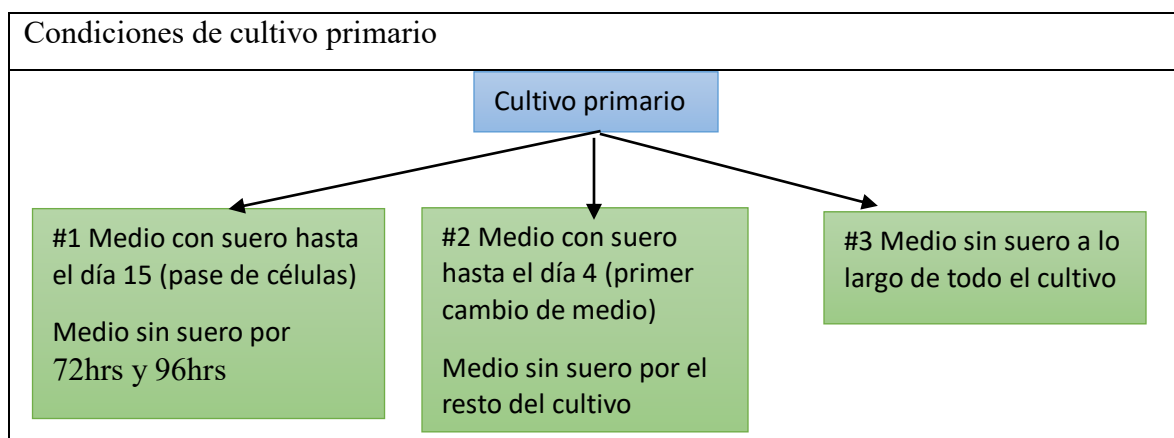
15min a 37°C. Pasado el tiempo se agregaron 200 µl de DNAsa (1mg/ml, Sigma), se agitó suavemente y se agregaron 300ul de suero fetal bovino (SFB) GIBCO, con el fin de detener la digestión. Enseguida se centrifugó durante 5-7min a 1100-1500rpm (Model TJ-R refrigeration unit Beckman) a temperatura ambiente. Se desechó el sobrenadante y se re-suspendió el botón en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, tras lo cual se le permitió un tiempo de recuperación al tejido de alrededor de 30min. Pasado el tiempo se continuó con la disociación mecánica al pasar el tejido con pipetas Pasteur de diámetros decrecientes (el diámetro se controla al pasar por el fuego la punta de la pipeta, mientras gira).

Las células se sembraron en medio suplementado con SFB al 10%. El medio está compuesto por DMEM/F12, glutamina, antibióticos, e insulina, ver concentraciones en tabla 2; debe de estar a 37°C y a un pH de 7.4. En promedio se sembraron células provenientes de 5 EM por caja Petri de 60x15mm -previamente tratada con Poli-L-lisina (200µg/ml)- en un volumen final de 5ml. El medio suplementado se cambió a los cuatro días, y posteriormente cada 48hrs, agregando un ligero exceso para limitar el efecto de pérdidas por evaporación. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de 90% se realizó un pase dividiendo el contenido celular de una caja en dos o tres. Esto se realizó tras tres lavados con Hank's agregando tripsina Invitrogen al 0.5%/0.025mM EDTA a 37°C durante 5min en incubación. Pasado el tiempo se despegaron las células con el flujo de líquido, con pipeta, al agregar Hank's a 37°C. Las células se recuperaron y se centrifugaron por 5mins a 1100-1500 rpm. Seguido a esto se realizó una disociación mecánica como la descrita anteriormente, y se completó el medio de modo que se agregó 1ml a cada caja Petri de 60x15mm, en un volumen final de 5ml. Una vez alcanzado un porcentaje alto de confluencia (80%) se cambió el medio con suero por medio sin suero (composición: DMEM/F12, glutamina, antibióticos, insulina, transferrina, trombina, selenio, putrescina y BSA, ver tabla 2). A esto se le denominó arresto, y las células se cosecharon a las 72 hrs y 96 hrs.

Tabla 2 | Suplementos para el medio de cultivo

Suplemento	[C]
Glutamina*	1mM
Antibióticos*	0.5X
Insulina*	3.3µg/ml
BSA	50µg/ml
Transferrina	10µg/ml
Trombina	100 U/ml ($1 \times 10^{-4} U/ml$)
Putrescina	$4.986 \times 10^{-2} mM$
Selenio	$1 \times 10^{-2} mM$

*Medio con suero.



Cosechando las células de las cajas una por una, se quitó el medio y se lavó una vez con 2ml de buffer de fosfatos de sodio (solución de fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 , y fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 , pH=7.2) frío. En seguida se agregó 1ml de buffer y con ayuda de un gendarme se raspó la caja para obtener las células. Éstas se pasaron a un tubo ependorf de 1.5ml y se agregó 0.5ml más del buffer a la caja para recuperar las células restantes, y agregarlas al tubo. Éste se centrifugó a 1100-1500rpm durante 7mins a 4°C. En seguida se

eliminó el sobrenadante, se congeló la pastilla y los tubos se guardaron a -70°C hasta su uso.

6.1.2 Cultivo organotípico de hipotálamo/eminencia media

El cultivo organotípico se realizó según el protocolo de Stoney *et al.* 2015, y según el protocolo proporcionado por la Dra. Fiordelicio (Facultad de Ciencias, UNAM), además de algunas modificaciones implementadas en el laboratorio:

Se extrajo el cerebro de ratas de 10 días post natal (± 2 días) y se colocó dentro de agar previamente hervido en microondas (3%). El agar se dejó solidificar a 4°C durante 10min. El cubo de agar con el cerebro se colocó en el microtomo (Vibratomo Lancer 1000) y se realizaron cortes de $250\mu\text{m}$ de grosor, en solución fría (casi congelada de Hank's). Éstas se recuperaron en la misma solución, y con la ayuda de material de disección y un microscopio se seleccionó la zona deseada (EM y zonas adyacentes, ver figura 10) y se removió el resto. Las rebanadas se transfirieron al medio empleado por Stoney *et al.* 2015: 25% de Suero fetal bovino inactivado por calor (Invitrogen), 25% Hank's, 50% MEM (medio esencial mínimo), adicionado con bicarbonato de sodio 2.2g/L, $\text{pH}=7.2$, glucosa (3.5g/L), antibióticos y glutamina (mismas que para el medio del cultivo primario). Seguido a esto se transfirieron a membranas de policarbonato ($0.4\mu\text{m}$ de porosidad) contenidas en pozos 24mm (Corning® Transwell polycarbonate membrane cell culture inserts). Cada pozo contuvo en promedio 2 EM (equivalente a ≈ 8 rebanadas) en el caso de los cultivos de hipotálamo, y 4 en el de EM. en un volumen de 2.6ml. Previamente, los pozos se mantuvieron durante un tiempo con medio dentro de la incubadora a 37°C y 7% de CO_2 (el protocolo requiere un 5%, pero por distintos motivos se tuvo que mantener a 7%).

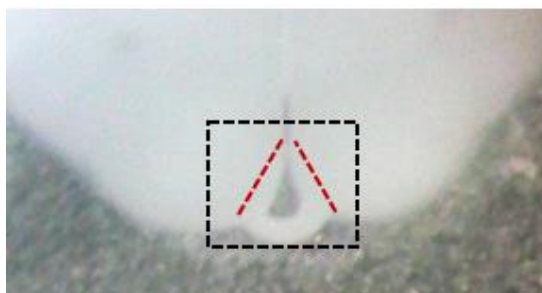
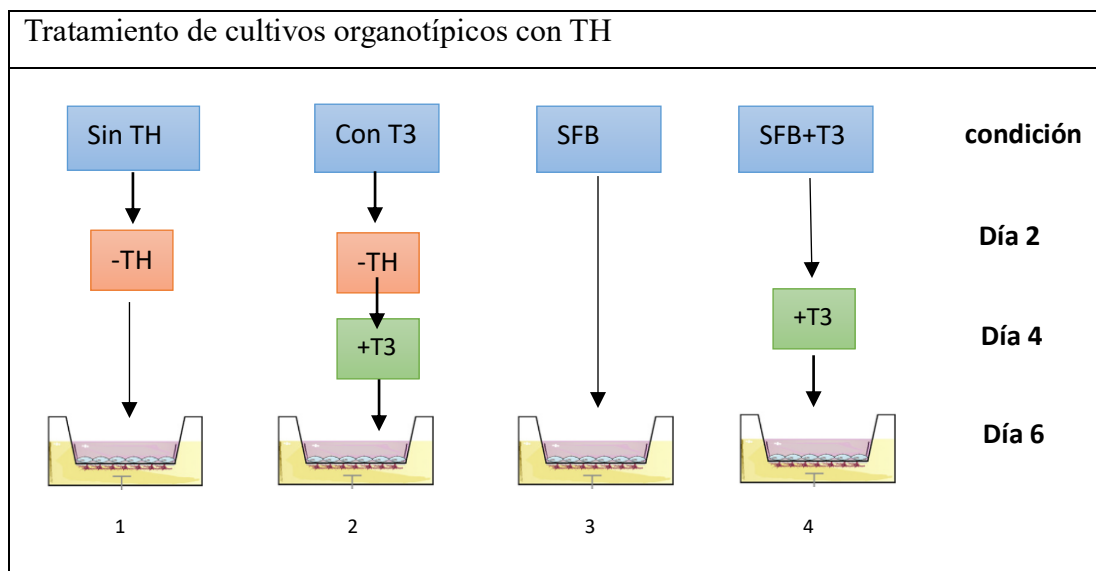


Figura 10. Rebanada $250\mu\text{m}$ de cerebro de rata de 10 días post natal. Las líneas punteadas delimitan las zonas

que se tomaron para realizar los cultivos, en negro para el primer cultivo (#4) de eminencia media y zonas adyacentes, en rojo para el resto de los cultivos.

Se realizó un cambio de medio a las 24hrs con el fin de reducir la contaminación que pudiera haber sido proporcionada por las condiciones iniciales (los cortes no se realizaron dentro de la campana de flujo laminar). Subsecuentemente los cambios se realizaron cada 48 hrs (cambios de medio parciales) hasta el día de la cosecha (cuatro o cinco o seis días). La cosecha se realizó con un lavado de buffer de fosfatos de sodio (solución de fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 , 0.23M y fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 0.2M, a $\text{pH}=7.2$), despegando el tejido a presión con la pipeta. Se centrifugó ligeramente, se quitó el exceso de buffer y se congeló a -70°C .

Para observar el efecto de la presencia de hormonas tiroideas en el medio sobre la actividad de la PPII en tanicitos en cultivo, se probaron condiciones estándares con suero fetal completo y depletado de hormonas tiroideas (SFB(-TH)). La remoción de las TH del suero fetal se hizo tratándolo con resina AG®1-X8 (0.05g/ml), por una hora en agitación suave. Las distintas condiciones que se probaron fueron las siguientes: control con SFB completo (3), medio con suero depletado de TH agregado a los cultivos a partir del segundo día (1), medio con suero depletado de TH adicionado al segundo día y adicionado con T3 ($1 \times 10^{-8} \text{ M}$) a partir del cuarto día de cultivo (2), y medio con SFB completo + T3 ($1 \times 10^{-8} \text{ M}$) adicionada desde el cuarto día de cultivo (4).



6.1.3 Procesamiento de las muestras para ensayo de actividad de PPII

Las muestras de células se descongelaron manteniéndolas en frío, y se suspendieron en 200µl de buffer de fosfatos. Se dispersó el tejido con un sonicador (Ultrasonic Homogenizer-4710 series), durante un tiempo de 6s (20-30% de amplitud máxima). El homogenado se recuperó en un tubo de ultracentrífuga. Las muestras se centrifugaron entonces a 85 000rpm a 4°C durante 40min. Seguido a esto se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50µl de buffer de fosfatos de sodio (monobásico y dibásico). Se volvió a disociar con el sonicador y se transfirió a un tubo Ependorf de 0.5ml. De los 50µl se tomaron 5µl para realizar una dilución 1:10 en buffer reservado para medir la concentración de proteína por el método de Bradford. Las muestras se congelaron a -70°C hasta su uso. Todo el procedimiento debe hacerse en frío para evitar la degradación de la proteína.

En el caso de los cultivos organotípicos no se realizó la extracción de las proteínas de membrana, pero se analizó la actividad directamente después de la sonicación del tejido.

6.1.4 Prueba de Bradford

Se realizó una prueba de Bradford para cuantificar la cantidad de proteína, la cual es colorimétrica y muy sensible. La curva estándar se realizó con BSA a 0.2mg/ml, se utilizaron diferentes cantidades de proteína: 0.5,1,2,4,6,8 y 10 µg en 160µl finales por duplicado en una caja multipozos (96 pozos, Costar, corning Inc.). Se completó el volumen de los estándares con buffer de fosfatos (monobásico y dibásico) a un volumen de 100µl y se agregaron 40 µl de reactivo de Bradford. Lo mismo se hizo para las muestras probando con dos cantidades, 5 y 15 µl. Se completó la muestra con buffer a un volumen de 100µl y se agregaron 40 µl de reactivo de Bradford. La caja se cubrió con Parafilm y se agitó suavemente. Después de 10 min de reposo se leyó la absorbancia tanto de todos los pozos a 595 nm en un espectrofotómetro para placas (Multiscan FC). A partir de esta información se determinó la cantidad de proteína presente en nuestras muestras, tomando como referencia los valores de la curva estándar ajustados según una función lineal de forma $y = ax + b$. Donde y corresponde al valor de la absorbancia y x a la cantidad de proteína en µg.

6.1.5. Ensayo de la actividad enzimática para la PPII

Las muestras se descongelaron en hielo. Se realizó, al momento de realizar el ensayo, la mezcla de reacción: Bacitracina/N-etilmaldeimida (10mM cada uno, la N-etilmaleimida inhibe a la PPI, quien corta el mismo enlace que la PPII, y la Bacitracina a la prolil endopeptidasa, que puede hidrolizar el enlace TRH- β NA), en buffer de fosfatos (pH=7.2), y muestra (\approx 20ul) en un volumen final de 100 μ l. Se agregó finalmente la DAPIV (Dipeptidil peptidasa IV) (quien hidroliza His-Pro-MCA o His-Pro- β NA, producto de la actividad de la PPII sobre el substrato, hacia His-Pro + MCA o β NA) en exceso (4.4 μ U/ μ l) y se pre-incubaron todos los tubos en agitación 5min a 37°C. Pasados los minutos se agregó la TRH-MCA (hormona liberadora de tirotropina-acoplada a metilcumarina, 100 μ M final, a temperatura ambiente) o bien TRH- β NA (acoplada a β -Naftilamida) a una concentración de 10mM (en un total de 87.5 μ l). La cinética empezó entonces, y se tomaron 17.5 μ l de muestra en cuatros tiempos, cada hora, sin un tiempo cero. Al tomar una muestra (se realizó lo más rápido posible) se agregó la misma cantidad de MeOH (17.5ul) y se agregaron 105ul de MeOH/buffer de fosfatos 1:1 frío para detener la reacción. Se mezcló por vórtex y se guardó a 4°C hasta el momento de cuantificar el producto (metilcumarina o β -Naftilamida).

En el caso de los cultivos organotipicos la reacción incluyó en una de las réplicas un inhibidor de la PPII, la O-fenantrolina 1mM, y se comparó la actividad de las muestras con o sin inhibidor.

6.1.6 Cuantificación del producto de la reacción en Nano-drop/fotómetro de fluorescencia, y cálculo de la actividad específica de la PPII

Antes de realizar la lectura del producto fluorescente, las muestras se centrifugaron 6min a 12 000rpm (las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente durante la medición). Se realizó primero una curva estándar con concentraciones conocidas de MCA (200pmol, 400pmol, 800pmol, 1200pmol y 1600pmol) /buffer de fosfatos/MeOH 1:1) o una calibración

con β -Naftilamida (β NA) 100pmol. Se midió la fluorescencia de la β NA/MCA liberada a una longitud de onda de 335nm de excitación y 410nm de emisión en un espectrofotómetro de fluorescencia (LS50B, Perkin Elmer). Se extrapolaron las cantidades de producto de acuerdo a los valores de la curva estándar ajustados según una función lineal de forma $y = ax + b$ en donde y corresponde a la β NA/MCA en pmol detectada, x es el tiempo de reacción en minutos, y a es la pendiente m . Las cantidades de producto de la reacción a lo largo del tiempo fueron ajustadas a una recta, cuya pendiente fue dividida por la cantidad de proteína, para obtener la actividad específica en pmol/min/mg.

6.1.7 Caracterización de tanicitos por inmunocitoquímica acoplada a inmunofluorescencia.

A) Cultivos organotípicos.

Se realizó un lavado con PBS 1X sobre la membrana de policarbonato empleada para la siembra de las rebanadas y se dejaron incubando por dos horas en paraformaldehído (PFA) 4% a temperatura ambiente (según el método empleado por Stoney *et al.*, 2015). Seguido a esto se realizaron tres lavados de diez minutos con PBS 1X, y se incubó por treinta minutos con suero normal de caballo 3% (SNC) para realizar el bloqueo, además de permeabilizar el tejido con Triton X-100 al 0.5% en base PBS 1X. Se dejó incubando a 4C° durante 24hrs con los anticuerpos primarios: anti-Vimentina policlonal (hecho en pollo, Chemicon®; Merck) diluido 1:4000 y anti-Nestina, monoclonal (hecho en ratón, Santa Cruz Biotechnology) 1:100 diluidos en PBS 1X y SNC15%. Al día siguiente se realizaron tres lavados con PBS 1X, y se dejaron incubando las rebanadas en solución de PBS 1X con anticuerpo secundario anti-pollo, policlonal (hecho en cabra Alexa Fluor®647) y anti- ratón policlonal (hecho en cabra, Alexa Fluor 488) 1:500 en condiciones de oscuridad. Después de la incubación con el anticuerpo secundario se realizaron 3 lavados con PBS1x, y se incubó durante 10 min con DAPI 1:3000 en base PBS 1X, tiempo tras el cual se lavó por última vez. Finalmente se realizó el montaje de los tejidos sobre porta-objetos con medio de montaje (citifluor, mounting médium, AF-1) y un cubre-objetos fijado con barniz. Las muestras se analizaron al microscopio de fluorescencia (Nikon, Diaphot 300) o confocal. En el caso del microscopio confocal (Olympus MPhot. Upright), las imágenes se obtuvieron usando dos canales de excitación: Alexa fluor 488nm y Cy5 635nm.

B) cultivos primarios

De manera similar al ensayo para las rebanadas, primero se realizaron 3 lavados de 10min de las células con PBS 1X. Luego se fijó el tejido 30min con paraformaldeído al 4%, se lavó dos veces con PBS 1X, y se bloqueó en una solución de suero normal de caballo (SNC) al 3%, permeabilizó con tritón X-100 al 0.5% en PBS 1X. Después de 30 min, se realizaron tres lavados más en PBS 1X, y se incubó toda la noche con la solución SNC 1.5%, tritón 0.25% y PBS1X con los anticuerpos primarios correspondientes: anti-Vimentina policlonal (hecho en pollo, Chemicon®; Merck) diluído 1:4000, anti-Nestina monoclonal (hecho en ratón, Santa Cruz Biotechnology) y anti-DARPP-32 1:100 policlonal (hecho en cabra, Santa Cruz Biotechnology). Transcurrido el tiempo de permeabilización, el cultivo se lavó nuevamente (tres veces) y en oscuridad se incubó con los anticuerpos secundarios en solución base PBS1X durante 2hr: anti-pollo, policlonal (hecho en cabra Alexa Fluor®647), Anti-ratón policlonal (Hecho en cabra Alexa Fluor® 647, Jackson ImmunoResearch) y Anti-cabra policlonal (hecho en bovino Cy™3, Jackson ImmunoResearch). En condiciones de oscuridad se hicieron tres lavados con PBS de 10min, se incubó con DAPI 1:3000 10min, y se lavó por última vez por 10min con PBS. Finalmente se colocó una gota del medio de montaje, se cubrió la muestra con un cubreobjetos y se selló con barniz.

6.1.8 Extracción y cuantificación de ARNs mensajeros

Las muestras obtenidas de los cultivos de 4 y 6 días se congelaron y mantuvieron a -70°C hasta su uso para extracción y purificación de ARNm (según el protocolo de Chomzynski y Sacchi, 1976). Sobre hielo seco, a un tubo con 4 eminencias medias se agregaron 400µl de solución D (compuesta por Tiocinato de guanidina 4M, citrato de sodio 2.5mM pH 7.0, sarcosyl 0.5%, mercaptoetanol al 0.1M). Inmediatamente se homogenizó el tejido con un sonicador (25-30% de la potencia máxima) las veces necesarias por 10s (rápidos) incubando 5 minutos cada vez sobre hielo. Las muestras se dividieron en dos tubos de tal manera que nuestra solución inicial de referencia fuese de 200µl. Se le agregó entonces el acetato de sodio 2M pH 4.0 (25µl) y se mezcló la reacción por vórtex 35s. Se agregaron 250µl de fenol saturado en agua y 3/10 del volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), tras lo cual

se agitó violentamente con vórtex durante un minuto. La muestra tomó un aspecto lechoso. Se dejó reposar 15min sobre hielo y después se centrifugaron las muestras 20min a 10 000rpm a 4°C (rotor 2427-A Mikro 200R, Hettich). Al finalizar el tiempo, se colocaron las muestras sobre hielo y se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo, teniendo cuidado de no hacer contacto con el menisco de la interfase. A éstos se les agregó 1½ porciones del volumen inicial de isopropanol frío, se mezclaron por vórtex 30s (rápidos) y se guardaron 3hrs a -20°C. Tras este tiempo se sacaron las muestras (siempre sobre hielo) y se centrifugaron 30min a 13500rpm a 4°C. El sobrenadante se eliminó por decantación eliminando restos sobre una gaza estéril, se resuspendió el botón en 1/3 del volumen inicial de solución D y se mezcló y se dejó incubando toda la noche a -20°C. Al día siguiente, tras mezclar las muestras y centrifugarlas 30min a 13 500 a 4°C el sobrenadante se decantó girando lentamente el tubo y se dejó evaporar 1min sobre hielo. Enseguida se agregaron 500µl de etanol 70% frío enjuagando todas las paredes y se dejó reposar 5mins sobre hielo. Se centrifugó entonces a 13 500rpm a 4°C por 19min y se decantó nuevamente el etanol. Para asegurarnos de que se elimine todo el etanol se centrifugó unos segundos el tubo y se eliminó el resto con la micropipeta y se dejó secar el resto por evaporación (3min). En ese momento o al día siguiente (si se deja, guardar a -70°C), se resuspendió el precipitado en 20µl de agua libre de ARNs y se mezcló suavemente por vórtex 3 veces de 30segundos rápidos. Para determinar la cantidad de RNA obtenida y su pureza, se leyó la absorbancia de las muestras a 230, 280 y 260 nm correspondientes a las sales, proteínas y ácidos nucleicos, respectivamente, tomando 2µl de muestra que se agregó a 398µl de agua libre de ARNs (agua milli Q tratada con 0.1% dietil pirocarbonato, inhibidor de ARNs durante toda la noche y sometida a dos ciclos en la autoclave). Inmediatamente después de calculada la concentración del ARN, se realizaron alícuotas de 1µg de RNA para realizar la transcripción *in vitro*. Estas se guardaron a -70°C.

6.1.9 Cuantificación de ARN específico por reacción de transcriptasa reversa y amplificación en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Según la cantidad de ARN obtenida, se realizaron los cálculos para saber cuántos µl de muestra tomar para tener 1 o 1.5µg de ARN en un volumen de 15µl, según la fórmula:

$$[C] = \frac{DO.FD.40}{1000}$$

En donde DO corresponde a la densidad óptica obtenida (en el aparato 1 OD=40µg/µl), y FD es el factor de dilución empleado. La RT-PCR se hace en 30µl. La mezcla se hace sobre frío según un orden y cantidades específicas, para 1 mezcla de reacción:

Tabla 3 | Reactivos para RT

	Para 30µl	[C] final
H ₂ O/DEPC	3.9ul	-
Buffer first strand	6ul	5X
DTT	3ul	0.1M
Oligo dT	1ul	0.5µg/µl
dNTPs mix	0.6ul	10mM (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)
Enzima RVT	0.5ul	200U/µl

*la enzima se agrega al final, con cuidado de no dejarla a más de 4°C.

Las muestras de ARN en 15µl se pre-incubaron 5min a 65°C con el fin de eliminar la formación de estructuras secundarias del ARN, se dejaron reposar 5min en hielo y seguido a esto se agregaron los 15µl de la mezcla de reacción a los 15µl de muestra/H₂O-DEPC conteniendo 1 o 1.5µg de ARN. Se dejó incubando la reacción 2hr a 37°C. Transcurrido este tiempo se guardaron las muestras a -20°C. La reacción de retro-transcripción nos permite obtener cDNA a partir de ARN por medio de una reacción llevada por la transcriptasa reversa, mientras que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) nos permite amplificar el cDNA a cantidades detectables.

En paralelo se preparó un gel de agarosa al 2% para correr 1µg de ARN (en un volumen final de 10µl de agua libre de ARNasa) +2µl de colorante. Las muestras en el gel se corrieron (a ≈130V) con el fin de separar y observar las bandas de ARN que indican la integridad de la muestra purificada.

La mezcla de reacción para la PCR se hace sobre frío y en un orden específico:

Tabla 4 | Reactivos empleados para reacción en cadena de la polimerasa

	Volumen para 50µl	[C] final
H ₂ O/DEPC	33-37	
Buffer de Taq Pol	5	10X
MgCl ₂	2.5	1.5mM
Oligo S	1	25pmol/µl
Oligo As	1	25pmol/µl
dNTPs	1	10mM
Taq polimerasa	0.5	5 U/µl
Muestra	3-4 (dependiendo del ARN)	-

La mezcla sin muestra se centrifugó unos segundos y se mezcló suavemente por vórtex. Tras distribuir la mezcla en los tubos eppendorf, se agregó la muestra. A continuación, se colocaron en el termociclador (eppendorf mastercycler gradient), el cual llevó a cabo la reacción. El programa se seleccionó según el cDNA por amplificar, tomando en cuenta el tiempo de desnaturalización de la doble hebra (95°C), el alineamiento de los oligonucleótidos (su T_m), de la síntesis del amplificado (72°C) y un tiempo de ciclo final, con 10min de recuperación a 4°C. Las secuencias de oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR se muestran en la Tabla 6. Las muestras se guardaron a 4°C, 20°C, o se prepararon para la electroforesis.

Primero se determinó el número de ciclos adecuados para la amplificación de cada ARN cuantificado en este trabajo, se probó el siguiente número de ciclos:

Tabla 5 | Prueba de ciclos para la amplificación de distintos cDNA.

ARN mensajero	Número de ciclos	µl de cDNA de una reacción de RT de 30 µl.
TRH	31-27	3µl
Ciclofilina	26-21	3µl
PPII	35-31	4µl
PPII*	35-31	4µl

6.1.10 Electroforesis en gel de agarosa y cuantificación de los productos de la reacción de RT-PCR

Los productos de la PCR se separan en geles de agarosa al 2% fundido en TBE1X. El TBE1X se calentó junto con la agarosa en el microondas hasta no ver lentejuelas (de agarosa), se vació sobre un molde nivelado y se dejó enfriar hasta que gelificara. Se colocó en una cámara de corrida sumergida en TBE0.5X frío, y se cargaron las muestras (10 µl de muestra + 2 µl de colorante + 5 µl de muestra control) en los pozos. La electroforesis se llevó a cabo a 100-150V durante ≈1.5hrs. Al terminar el tiempo de corrida el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (3mg/L) durante 12-15mins tras lo cual se lavó durante el doble de tiempo con agua destilada. Finalmente se observó el gel en el transiluminador de UV y se capturó la imagen (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ System with Image Lab™ Software, BIO-RAD). El análisis de los resultados se hizo calculando el cociente entre el volumen del amplificado de muestra x dividido entre el valor del volumen del amplificado del control interno, en este caso, la ciclofilina. En la tabla 6 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos empleados para cada ARNm cuantificado:

Tabla 6 | Secuencias de oligonucleótidos empleados para la PCR

25pmol/µl	Oligonucleótido sentido	Oligonucleótido anti sentido
TRH	5'CCC TGG ATG GAG TCT GAT GT 3 T _m =64°C	5'GAC AGC TAG TGA AGG GAA CAG G 3
PPII	5'CTG GAT CGC ATA CAA AAA 3 T _m =60°C	5'GGA CAC CCA AAT AAT TGC T3
PPII*	5'GTG CAGGCC TGA TTG ATG ATG T _m =60°C	5'TCA GTG TGT GCA TTC ACA CAG
Ciclofilina	5'GGG GAG AAA GGA TTT GGC TA3 T _m =64°C	5'GGC TGG ATG GCA AGC ATG T 3

7.0 Resultados

7.1 Cultivos primarios

7.1.1 Inmunofluorescencia

Se hizo un seguimiento del crecimiento celular durante todo el tiempo de cultivo. Lo que se pudo observar fueron células con una morfología alargada, con cuerpos pequeños. Del cultivo #1 (en medio con suero hasta el pase) se tomaron muestras para un ensayo por inmunofluorescencia que fueron realizados con el apoyo del M. en C. Adair Rodríguez. Éste resultó positivo para vimentina, nestina y DARPP-32 (fig. 11), aunque el número de células marcadas para los dos últimos no es muy elevado con respecto a la cantidad de núcleos marcados con DAPI.

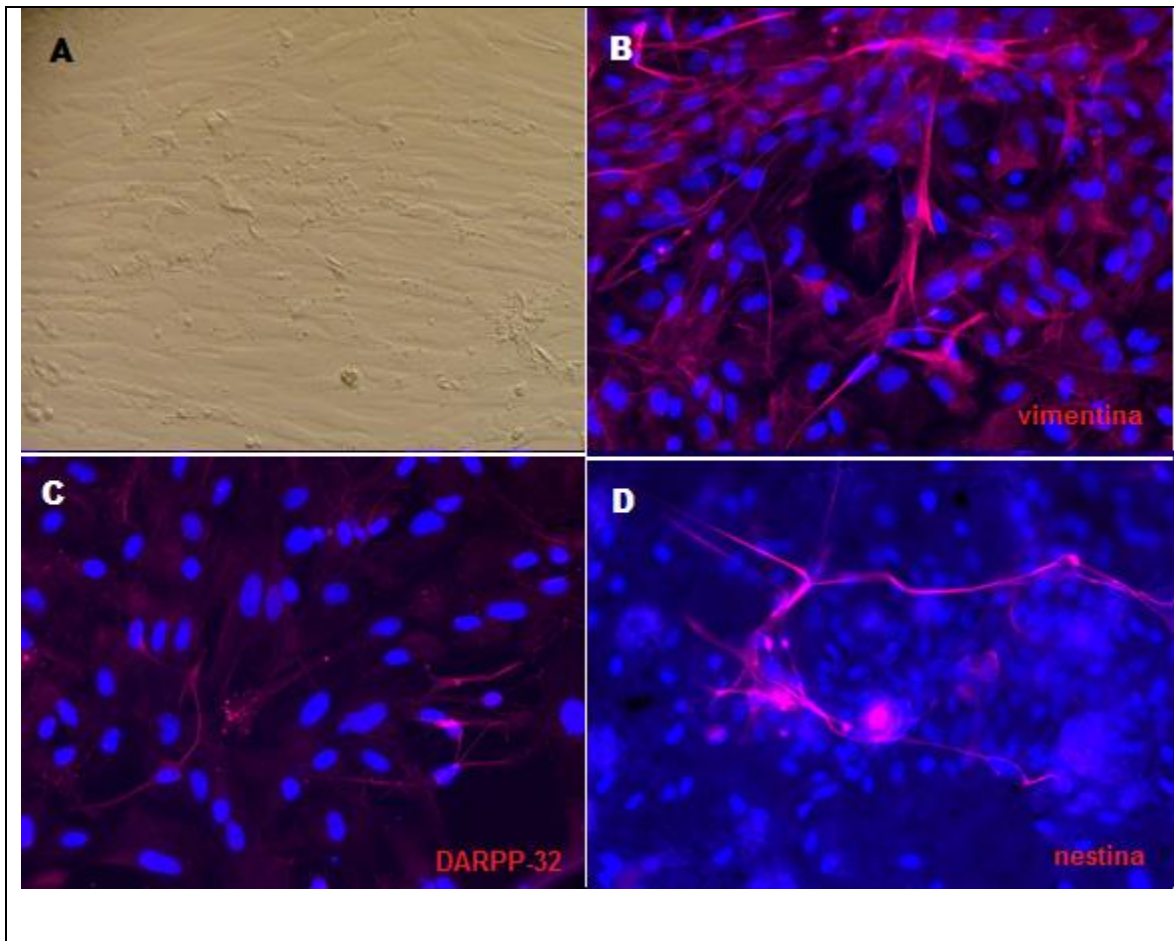


Figura 11. Un cultivo primario de eminencia media expresa marcadores específicos de tanicitos. Las imágenes corresponden al cultivo #1 A) morfología característica de tanicitos visible en microscopía de campo claro B) C) y D) caracterización del cultivo de tanicitos por inmunofluorescencia, empleando anticuerpos contra

vimentina, DARPP-32 y nestina, en ese orden. Las señales para vimentina, DARPP-32 y nestina se muestran en rojo, mientras que en azul se muestran los núcleos celulares marcados con DAPI.

7.1.2 Western blot

A partir de los mismos cultivos, se realizó un Western blot para comparar *in vitro* la proporción de proteína de PPII/PPII* con lo anteriormente observado *in vivo* (ver antecedentes).

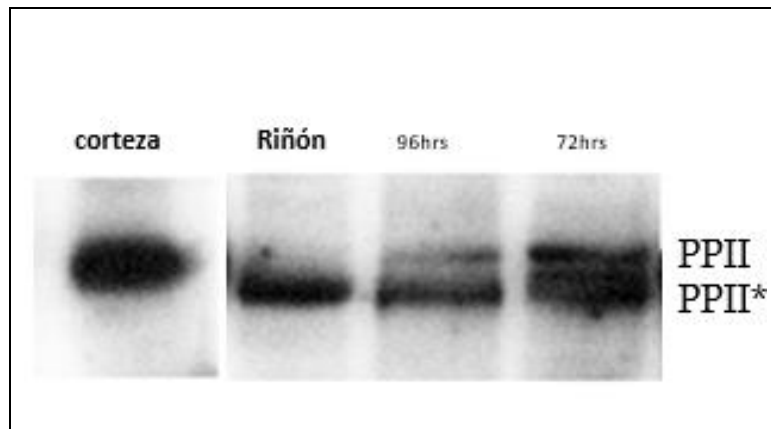


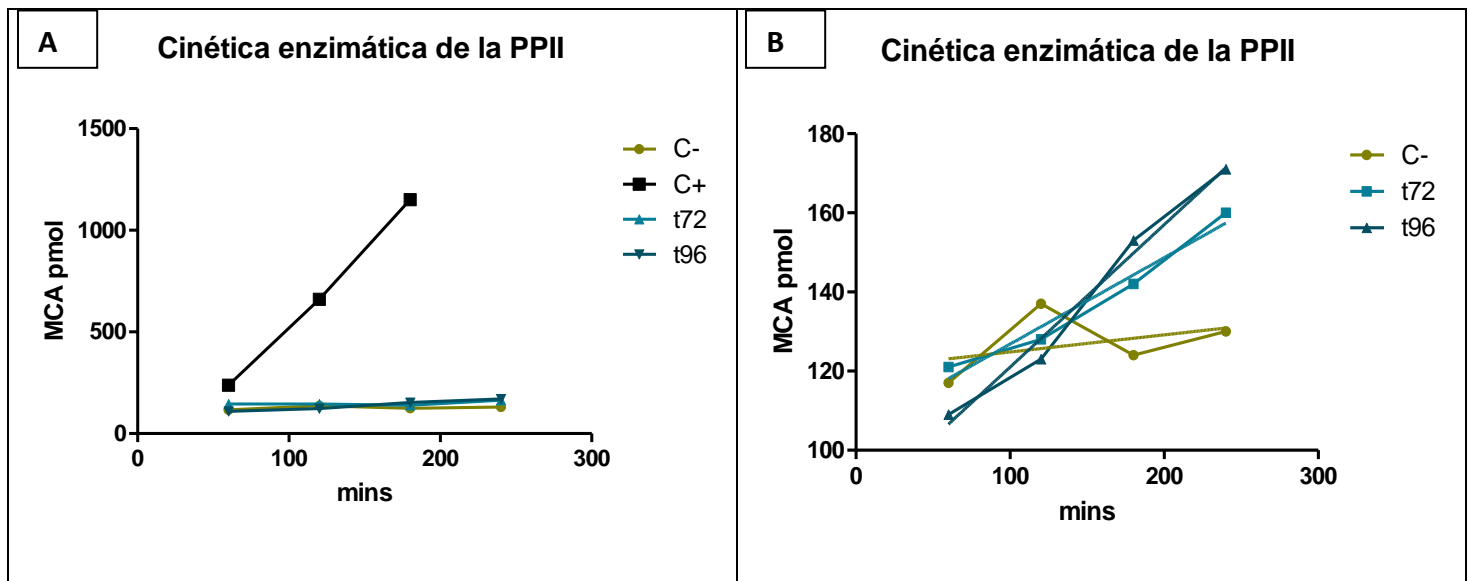
Figura 12. Detección de la proteína de PPII y PPII* por Western blot de extracto de células cultivadas *in vitro*. Las bandas corresponden a las proteínas de PPII y PPII* expresadas en cultivos primarios de eminencia media de rata. Se empleó como control positivo para la PPII* tejido de riñón, y para la PPII completa tejido de corteza cerebral. 96h y 72h corresponden a muestras obtenidas de cultivo primario.

En este experimento, la proteína PPII* parece expresarse en mayor intensidad con respecto a la forma completa, similar a lo observado en tejidos sin actividad enzimática como el riñón, y contrariamente a lo observado en la corteza o *in vivo* en la eminencia media.

7.1.3 Cuantificación de actividad enzimática de PPII en cultivos primarios empleando TRH-MCA como sustrato.

Se realizaron los cultivos empleando las condiciones anteriormente estandarizadas en el

laboratorio de Neuroendocrinología con un medio con suero fetal bovino 10%. Similar a lo previamente observado, no se pudo observar actividad de la PPII bajo estas condiciones (no se muestran los datos). Con el fin de controlar el entorno de nuestro cultivo modificamos el medio quitando el SFB y adicionamos los suplementos mencionados en la tabla 2. Se realizaron distintas pruebas cambiando a medio sin suero suplementado con distintos reactivos en distintos tiempos del cultivo. En la figura 13 (A y B) se observan las determinaciones en estos cultivos (mantenidos por 18-19 días) de la actividad enzimática de la PPII determinada con TRH-MCA como sustrato. Los cultivos se mantuvieron con suero hasta la resiembra, tras la cual se reemplazó el medio con suero por el medio sin suero y se cosechó 72 y 96 horas después. A pesar de que se observa una diferencia notable entre el control positivo con las muestras en cultivo, es visible una pendiente que no se observa en el control negativo (mezcla de reacción sin proteína). En C se observa la actividad específica de las muestras comparada con la del control.



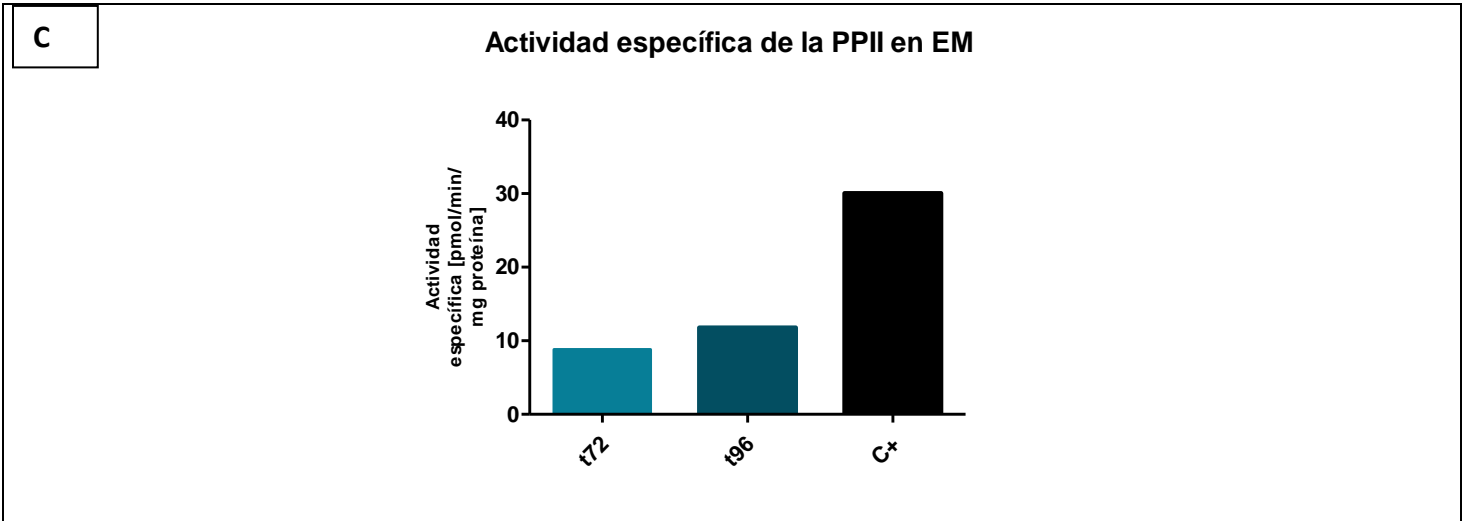


Figura 13. Cinética enzimática y actividad específica de la PPII en cultivo primario de EM. a) t72 corresponde a la muestra cosechada a partir de un cultivo con 72hrs de medio sin suero y suplementado; T-96 corresponde a la muestra cosechada a partir de un cultivo de 96hrs sin suero y suplementado; el control- corresponde a una mezcla de reacción sin muestra, y control+ muestra la actividad de un homogenizado de cerebro de rata b) misma gráfica a otra escala sin el control positivo c) comparación de la actividad específica de la PPII determinada en las dos muestras y el control positivo. n=2. La cantidad de proteína fue de 1.98 y 2.413 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para 72 y 96hrs, respectivamente, mientras que el control suele ser de 4.44 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Se sembraron igualmente cultivos a los cuales se les substituyó el medio con suero por medio sin suero al cuarto día de cultivo (fig. 14), comparado con un cultivo sin suero desde el inicio (fig. 14B). Estos duraron hasta 16-17 días, sin embargo, no se observa una pendiente, característica de la actividad enzimática.

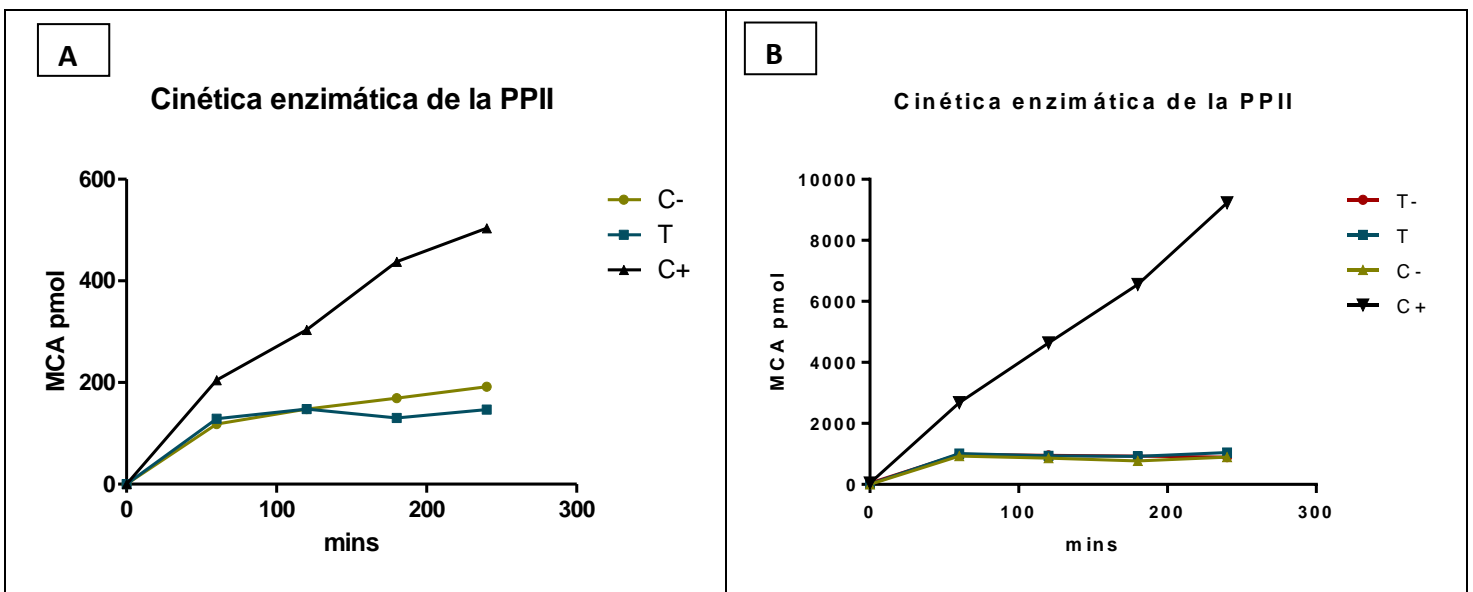


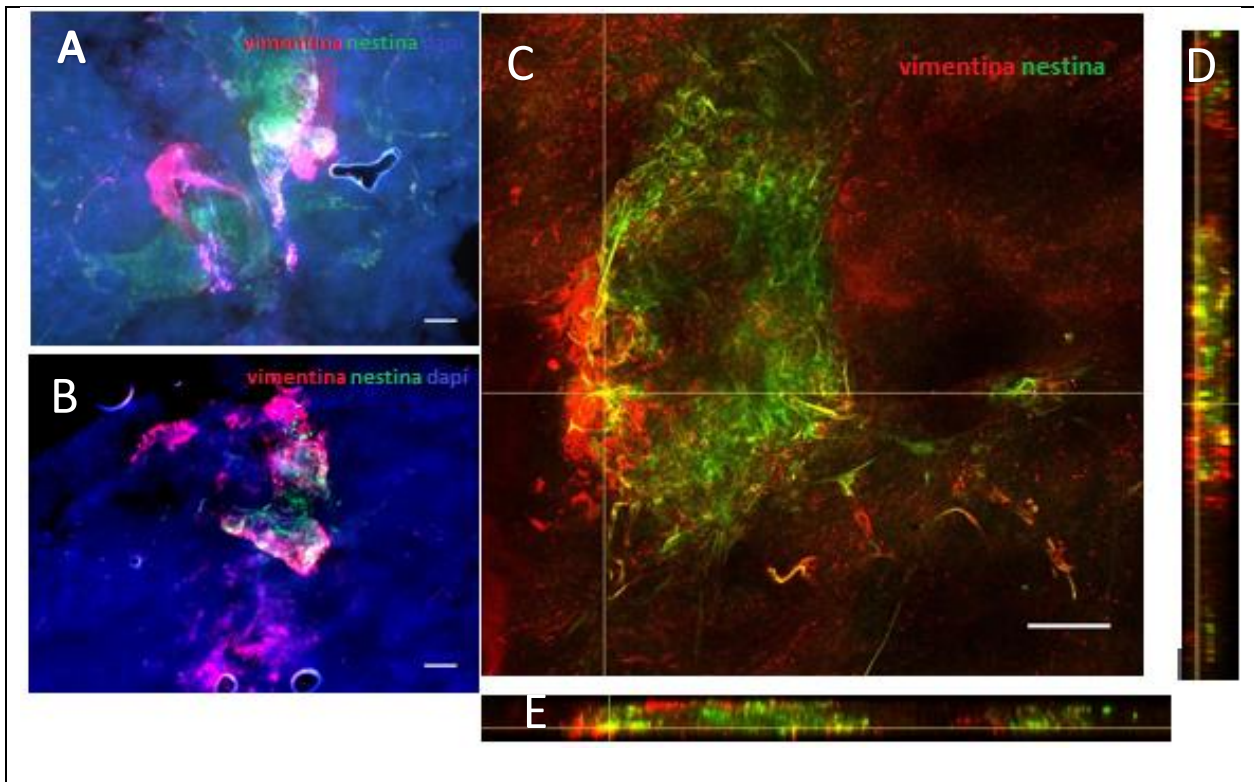
Figura 14. Cinética enzimática de la PPII en cultivos primarios. A. muestra (T) proveniente del cultivo #2, es decir, con SFB hasta el cuarto día (con una concentración proteica de 2.505 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). B. Actividad enzimática del cultivo #3 sin suero durante todo el cultivo (T-) y con medio sin suero a partir del cuarto día (T). Las células se cosecharon a los días 15 y 16 para los cultivos #2 y #3, respectivamente. Con una $n=2$, cada tubo de reacción contiene la cosecha de 2-3 pozos.

Se repitieron las condiciones del cultivo #1, con 72 y 96 horas de medio suplementado (datos no mostrados) en los que no fue posible medir actividad, y la cantidad de proteína cosechada era muy baja o nula.

7.2 Caracterización de cultivos organotípicos de eminencia media de rata

Se realizaron cultivos organotípicos de eminencia media y zonas adyacentes en rebanadas con el fin de mantener las propiedades estructurales y de señalización del tejido.

7.2.1 Inmunofluorescencia



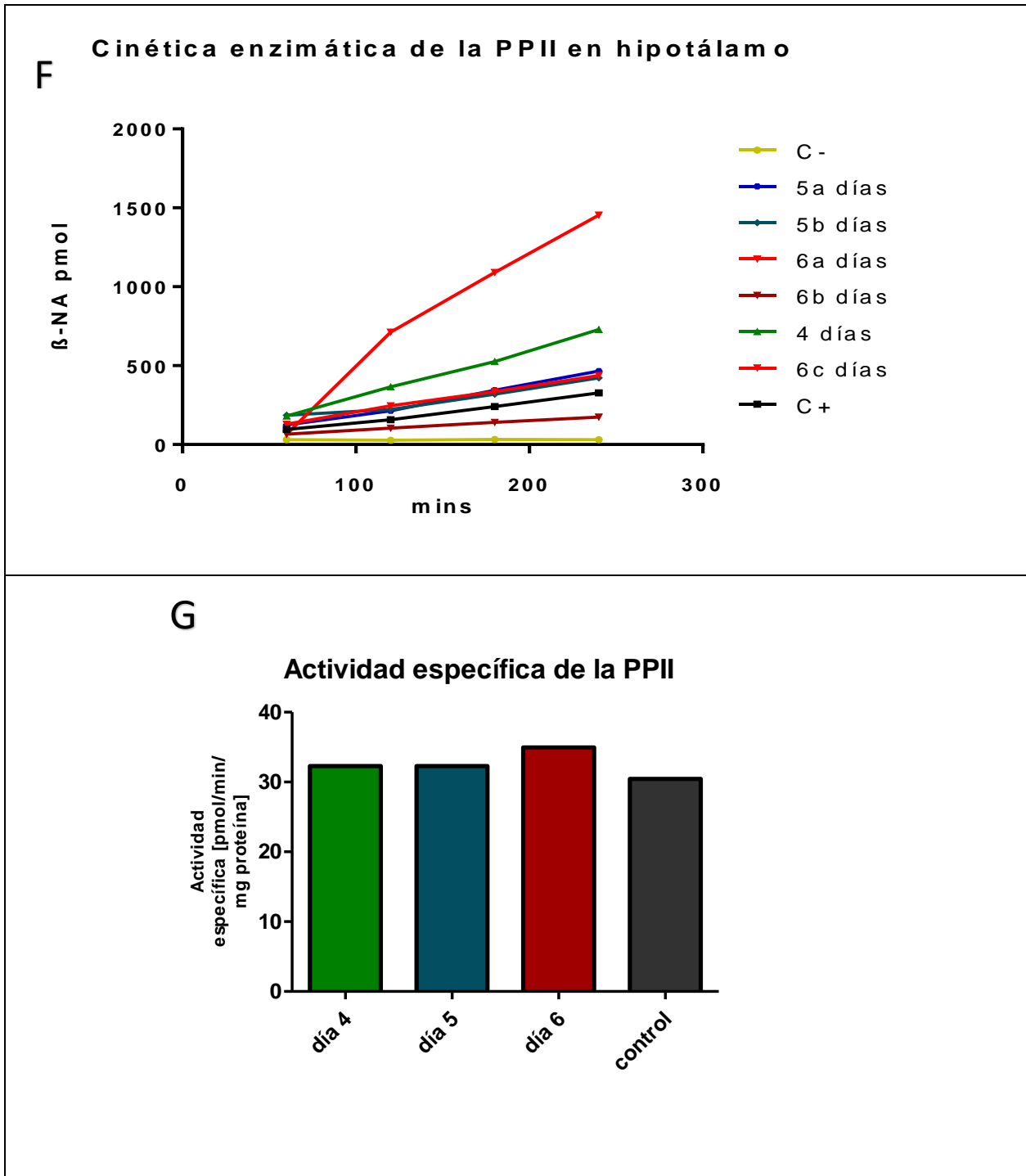


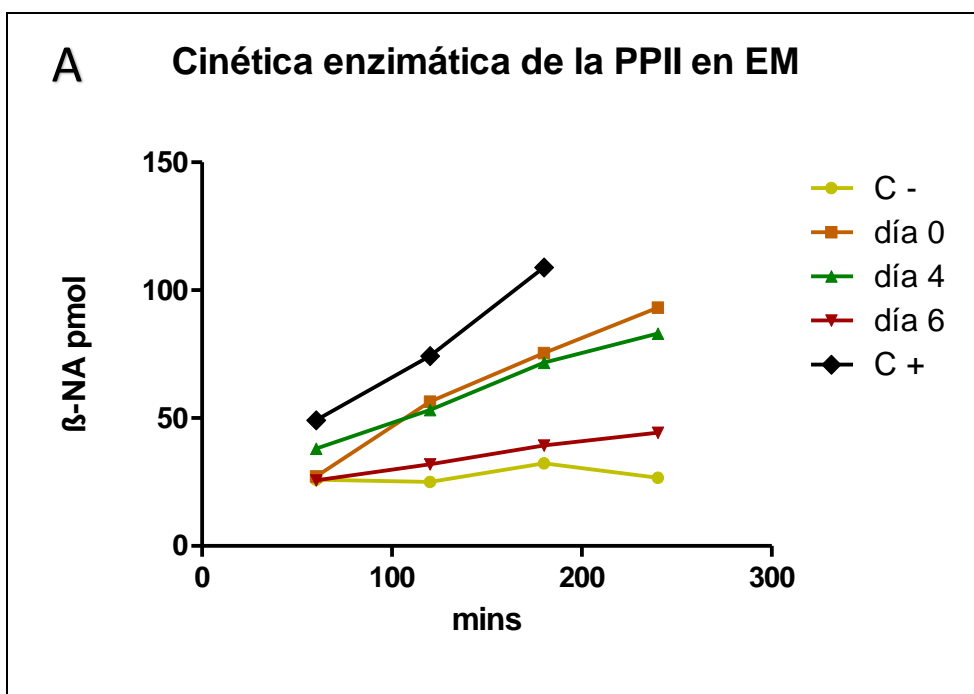
Figura 15. Cultivo organotípico de eminencia media y zonas adyacentes/hipotálamo. Los datos corresponden al cultivo #4. A y B inmunofluorescencia de rebanadas de hipotálamo en cultivo con anticuerpos contra vimentina (rojo), nestina (verde) y DAPI (azul). Se observa co-localización de los marcadores específicos para tanicitos en algunas regiones. C, D y E, tejido visto al microscopio confocal en los planos Y;X, Y;Z y X;Z, respectivamente. Se observan nuevamente los marcadores específicos vimentina (rojo) y nestina (verde) en colocalización. F, Cinética enzimática de la PPII en distintas muestras de 4, 5 y 6 días de cultivo. G Actividad

específica comparando con un control positivo correspondiente a un homogenizado de membranas de corteza cerebral de rata. Los niveles de proteína son variables, entre 1.5 y 6.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con respecto a un control de ≈ 4.4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Día 4 n=1; 5 n=2; 6 n=3. Cada pozo con 2 EM, y el ensayo hecho por duplicado.

7.2.2 Actividad enzimática

Se realizó un ensayo de actividad enzimática como aquellos descritos previamente (con TRH- β NA como sustrato en lugar de TRH-MCA). La actividad específica fue muy notoria, como se observa en la figura 15 F y G. A pesar de que el rango de β NA detectado varió bastante entre las muestras, casi todas (a excepción de una de 6 días en cultivo) mostraron una actividad enzimática de la PPII mayor a la del control positivo.

Con el fin de observar si la actividad de los cultivos se ve modificada por la duración del cultivo (es decir que haya un decaimiento de la actividad relacionada a la muerte del tejido) se cosecharon muestras de cultivos con distinta duración (0, 4 y 6 días) y se midió la actividad enzimática (fig. 16). El “día 0” corresponde a un control positivo *in vivo*. No se observa mucha diferencia en la actividad específica al día 4 o al 6.



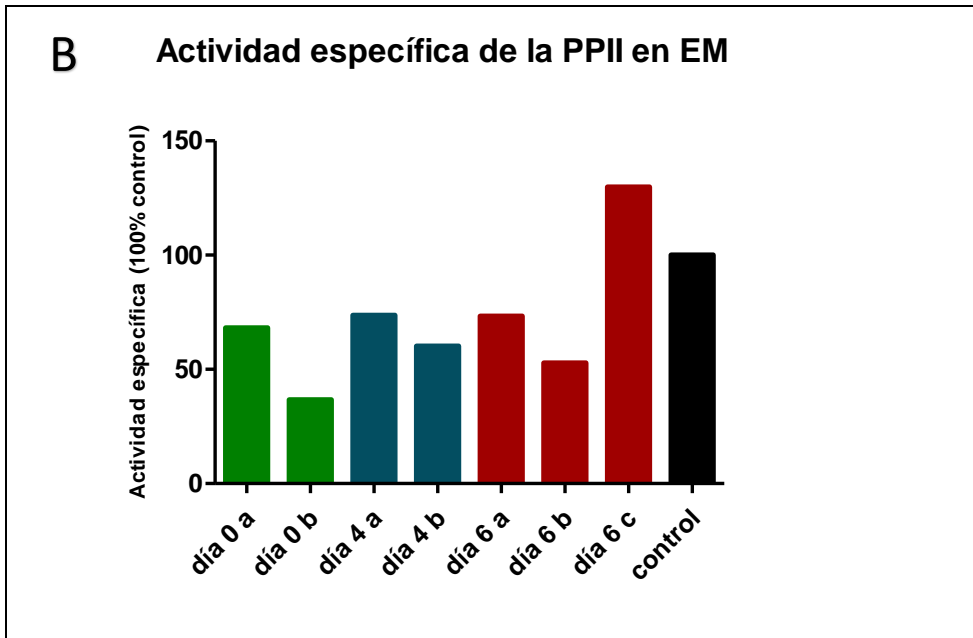


Figura 16. Actividad de la PPII en rebanadas de eminencia media a distintos días de cultivo (datos correspondientes únicamente a un cultivo #5). A) Cinética enzimática y B) actividad específica calculada para la PPII en rebanadas de eminencia media en cultivo al día 0, 4 y 6. a, b y c indican réplicas de las condiciones de cultivo. $n \geq 2$, con 4 EM por pozo, ensayo de actividad por duplicado.

7.2.3 Efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la PPII en cultivos organotípicos

Seguido a esto se realizaron pruebas con hormonas tiroideas. En la figura 17 se muestran los resultados de la actividad enzimática de los cultivos en rebanadas bajo distintos tratamientos: (ver diagrama en metodología). Todos los pozos se cultivaron inicialmente con suero sin depletar. A los pozos con las condiciones 1 y 2 se les cambió el medio por uno con suero depletado a los dos días de cultivo mientras que a los pozos con condiciones 3 y 4 se les dejó el medio con suero sin tratar. Al cuarto día de cultivo se volvió a agregar medio con suero depletado de TH a los pozos 1 y 2, pero se agregaron T3 1×10^{-8} al pozo 2, mientras que a los pozos 3 y 4 se les volvió a poner medio con suero sin tratar, adicionando con T3 a una concentración de 1×10^{-8} M el pozo 4. La cosecha se hizo al día 6.

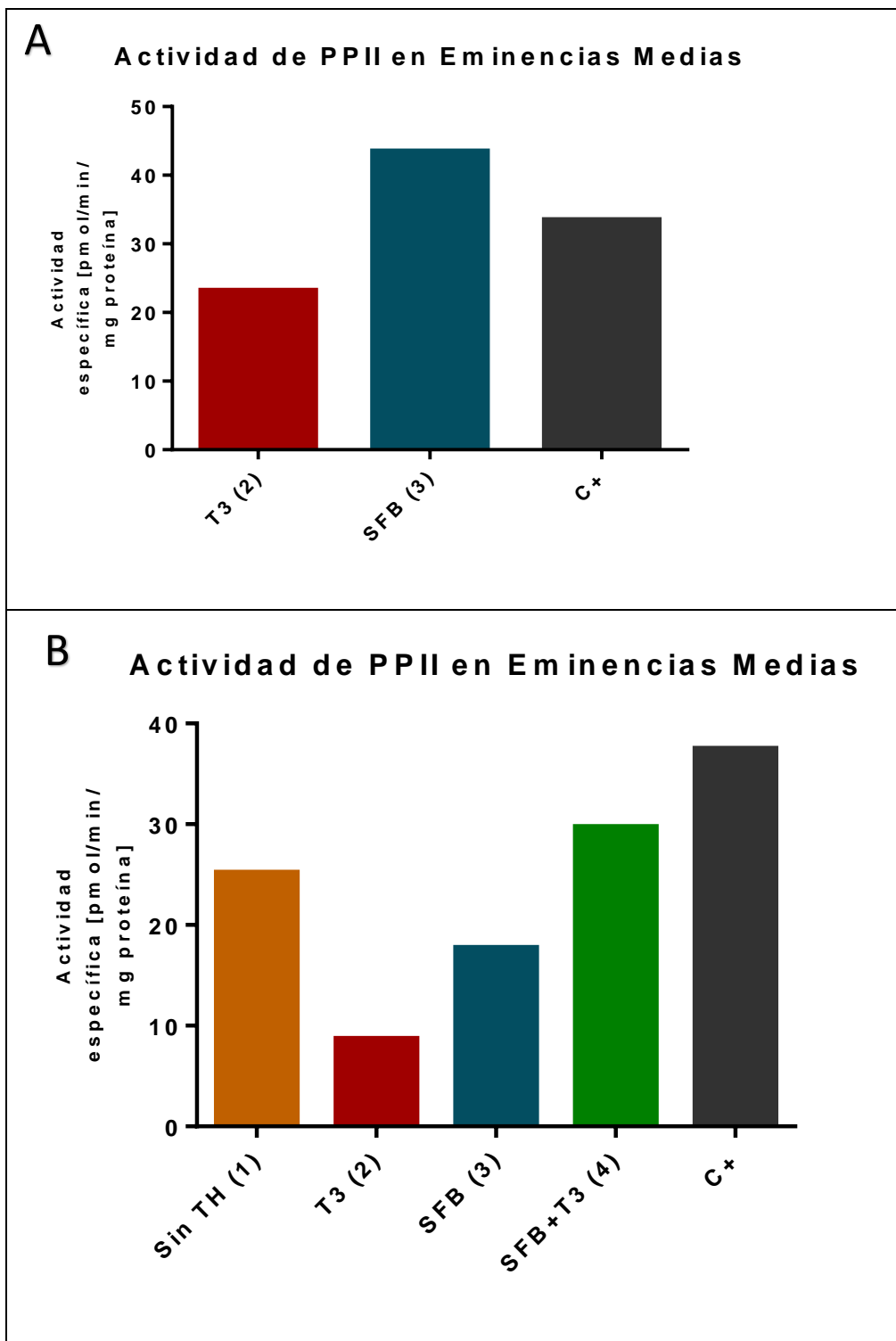


Figura 17. Actividad específica de la PPII en cultivos organotípicos de EM bajo distintos tratamientos. Todos los datos pertenecen a cultivos de 6 días. A y B corresponden a dos experimentos distintos en los que se trataron las mismas condiciones. SFB, suero fetal bovino; C⁺, control positivo (homogenizado de membranas de cerebro). Cada pozo con 4 EM, ensayo de actividad por duplicado para A. 2 pozos por condición.

Se observa una tendencia a incrementar la actividad de la PPII en proporción de la cantidad de T3 en el medio, excepto para el caso en el que se empleó suero depletado.

7.2.4 Extracción y Cuantificación de los ARNm de PPII y PPII* por RT-PCR

Con el fin de elucidar la relación entre expresión de PPIIc y PPII* en los cultivos organotípicos, y si la actividad específica corresponde a la proteína presente en el tejido disectado o a proteínas transcritas durante el experimento se realizó una RT-PCR semi-cuantitativa para determinar si había o no presencia de PPII y la PPII* en los tejidos cosechados al cabo de 4 y 6 días de cultivo. Se midió además el mensajero de la TRH tomando en cuenta lo observado por la Dra. Cote-Vélez anteriormente, quien detectó presencia del mensajero en eminencia media disectadas, y que nos sirve de control.

Se logró extraer el ARN total proveniente de las rebanadas de eminencia media (rendimientos en la tabla 7). Se realizaron entonces pruebas para determinar el número de ciclos adecuado para la amplificación (tabla 5). Los resultados muestran la presencia de los RNAs para ambas isoformas, así como del mensajero de la TRH (Figura 18). Para este último se empleó como control negativo una reacción de PCR sin muestra de ARN en el número de ciclos óptimo para la detección de ARNm de TRH, de la cual no se obtuvo amplificación (fig. 19B).

Tabla 7 | Cantidad de ARN obtenido de la extracción de las muestras de cultivos organotípicos.

Muestra (días)	Absorbancia ARN 260nm	ARN total µg/µl
4	0.011	0.088
4'	0.012	0.096
6	0.017	0.136
6'	0.011	0.088
4b	0.015	0.12
4b'	0.039	0.312
6b	0,013	0.104
6b'	0.015	0.12

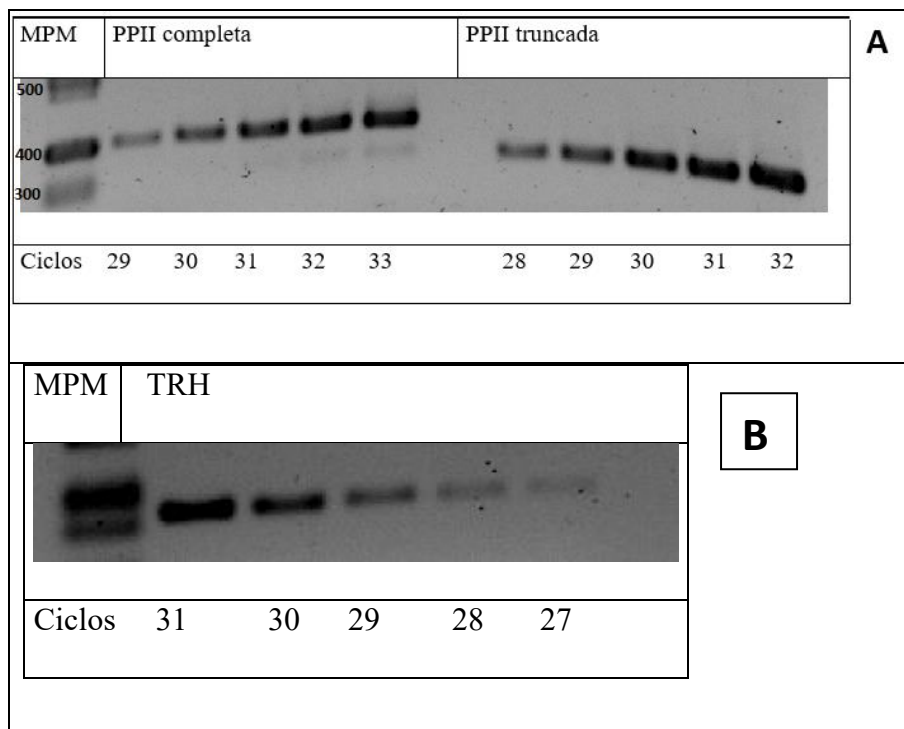
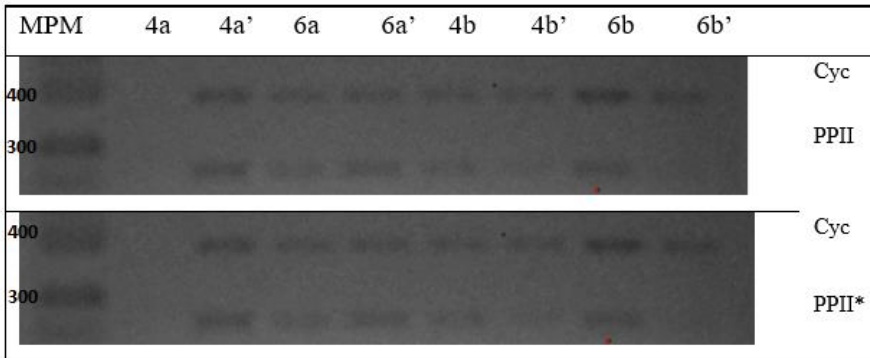
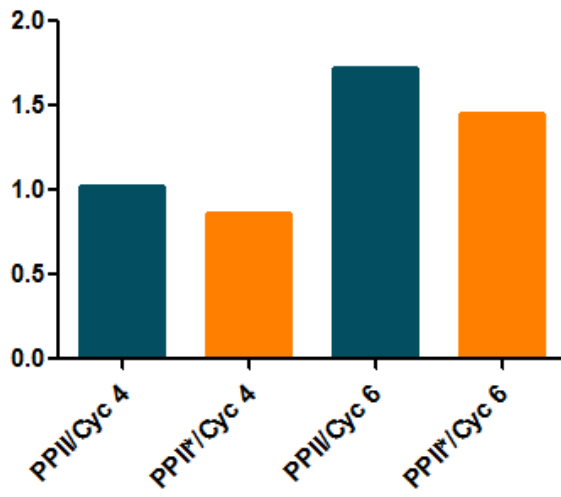
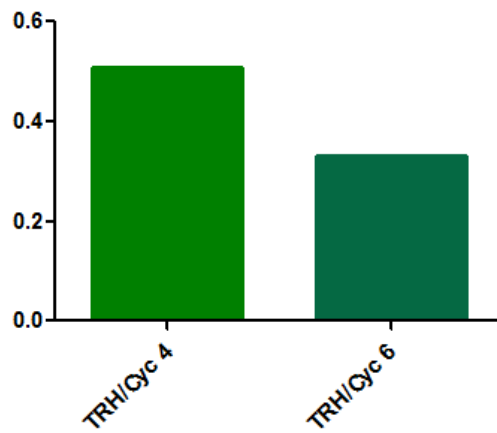


Figura 18. Cinética de amplificación de la reacción de PCR en 1 μ g de cADN para los mensajeros de la PPII y PPII* (A), TRH (B) a distintos números de ciclos de amplificación. Las bandas teñidas con bromuro de etidio corresponden al peso molecular esperado del fragmento amplificado.

La densidad óptica de las bandas de ADN correspondientes a los transcritos de PPII, PPII* y TRH en la electroforesis fue dividida por la densidad óptica producida por la banda del control interno (ciclofilina). Los resultados (fig. 19) muestran una tendencia a aumentar el mensajero tanto de la PPII como de la PPII* entre los días 4 y 6, y disminuir el de la TRH a lo largo de los días 4 y 6 en cultivo.

A**PPII y PPII*/Cyc****B****TRH/cyc**

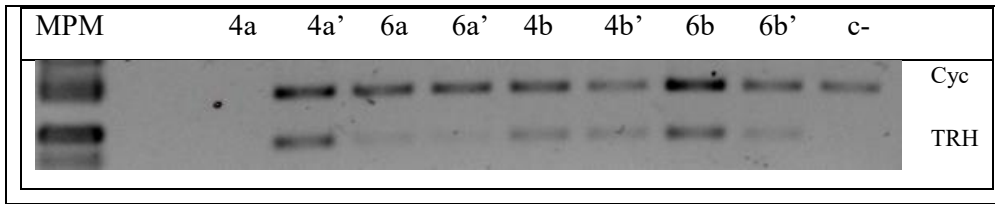


Figura 19. Expresión del ARNm en cultivo organotípico. En los días 4 y 6 de cultivo A) cociente del mensajero de PPII/Cyc, en azul, y PPII*/Cyc en naranja B) cociente TRH/Cyc. En la parte inferior de A y B se muestra el resultado de la electroforesis en gel teñido con bromuro de etidio y expuesto a luz ultravioleta para todas las muestras (día 4 y día 6): a y b corresponden a cultivos independientes, y “prima” corresponde al duplicado. Cada muestra contiene 2 eminencias medias. MPM, marcador de peso molecular; Cyc, ciclofilina.

8.0 Discusión

Con el fin de estudiar la regulación de la expresión y actividad de la PPII de tanicitos decidimos optimizar un enfoque *in vitro* que nos permitiera reducir el número de reguladores potenciales que existen *in vivo* (como la producción local de TH, la TRH, moléculas provenientes de la periferia etc.). Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio se basaron en la realización de cultivos primarios de células de la eminencia media de rata en medio suplementado con suero. Sin embargo, los resultados iniciales no fueron satisfactorios debido a que no se logró detectar la actividad de la PPII a pesar de que previamente se había realizado una ontogenia en la cual se observó un incremento de la actividad y de la cantidad de proteína de PPIIc en la eminencia media en las primeras semanas de vida. Mientras que en los cultivos primarios cultivados con suero no se detectó actividad alguna en condiciones basales o bajo distintos tratamientos (resultados no publicados). Además, la proporción de proteína de PPIIc/PPII* parece invertirse cuando se mantienen los tanicitos *in vitro* en comparación con lo observado en tejidos *in vivo*. Estos resultados preliminares nos llevaron a pensar que las condiciones basales de los cultivos primarios son responsables de este cambio de proporción de las isoformas, lo que generaría un exceso de PPII*, una forma dominante negativa de la PPIIc, inhibiendo así su actividad. Por esta razón, se estableció como objetivo del presente trabajo hallar las condiciones de cultivo que reviertan esta relación, para poder tener un sistema *in vitro* útil para el conocimiento de los mecanismos

que regulan a la PPII en los tanicitos y, por consecuencia, al eje HPT. Para esto, se probaron distintos tipos y condiciones de cultivo. La actividad de la enzima se observó en los cultivos organotípicos de hipotálamo y de eminencia media, pero no en los cultivos primarios dispersos, de modo similar a lo encontrado en el estudio anterior.

8.1 Cultivo primario

El tiempo de cultivo fue de entre dos y tres semanas, de manera similar a aquellos cultivos realizados por Prevot *et al.* 2003, y a diferencia de los cultivos del equipo de trabajo del Dr. Perelló, los cuales duran una semana (De Francesco *et al.*, 2017), o los cultivos de 4-7 semanas (Chauvet, Privat, & Alonso, 1996). Los primeros cultivos se realizaron en un medio DMEM/F12 con suero al 10%; sin embargo, al constatar ausencia de actividad enzimática, se realizó el cambio de medio a medio sin suero suplementado y adicionado al cultivo en distintos tiempos *in vitro*. Además de los suplementos glutamina, insulina, putrescina, antibióticos (como en Prevot *et al.*, 2003), albúmina sérica bovina, trombina y transferrina (De Francesco *et al.*, 2017) anteriormente empleados, se le agregó selenio al cultivo. Este último es un suplemento esencial para cultivos con medio desprovisto de suero (Saito & Takahashi, 2002), principalmente como cofactor de enzimas que contribuyen a la protección ante el estrés oxidativo (Villette *et al.*, 1998).

No se realizó un conteo celular al inicio del cultivo, si no que se sembró una cantidad preestablecida (≈ 5 eminencias medias por caja) que permita alcanzar la confluencia (90% de recubrimiento de la caja Petri de 60x15mm) en un tiempo razonable. El estado morfológico se observó a lo largo del cultivo por microscopía de contraste de fases. Con esto, se pudo llevar un seguimiento del crecimiento o muerte de los tanicitos. Al igual que con los cultivos realizados anteriormente por el M. en C. Adair Rodríguez, se pudieron distinguir varias células con la morfología observada en los cultivos de tanicitos del grupo de De Seranno *et al.* (2004), es decir, con un cuerpo pequeño y largas proyecciones (fig. 12A y 8A y B).

El ensayo por inmunofluorescencia de estos cultivos (medio con suero) resultó positivo para los marcadores de tanicitos vimentina, nestina y DARPP-32. Sin embargo, se mostraron pocas células marcadas para nestina y DARPP-32, contrariamente a lo esperado, dados los resultados de Chauvet *et al.* (1996) y Prevot *et al.* (2003), en los cuales se vieron numerosas células con marca positiva para DARPP-32 en cultivos de tanicitos (>80%). La vimentina nos indica la presencia de tanicitos tanto α como β (además de células ependimales), mientras que nestina y DARPP-32 son más específicas de tanicitos β (ver tabla 1). Es posible, entonces, que en estos cultivos estén presentes tanicitos β (aunque en minoría), de tal modo que la actividad de la PPII sea baja.

Además de las células con morfología típica de tanicitos, pudimos observar en los cultivos células similares a fibroblastos. Otros grupos también han señalado la presencia de células con esta morfología (De Francesco *et al.*, 2017). Esto podría explicarse por el hecho de que posiblemente el cultivo primario contenga células endoteliales obtenidas a la hora de disecar el tejido. Éstas, al encontrarse escasas en cultivo, adquieren una morfología similar a la de los fibroblastos (Guo *et al.*, 2006). Sería interesante caracterizar, por medio de marcadores específicos, otros tipos celulares presentes en nuestros cultivos. Estos mismos cultivos sirvieron para analizar la proporción de PPII/PPII* por Western blot, mostrando una mayor cantidad de la isoforma truncada en comparación con la forma completa (fig. 9), aunque ambas están presentes.

Se esperaba que el cambio de medio con suero a medio sin suero conteniendo los nuevos suplementos permitiera el arresto de la proliferación y una diferenciación más cercana a la de los tanicitos *in vivo*, y en particular expresión de la PPII activa; sin embargo, al momento de realizar el ensayo de actividad, casi no se observó diferencia con los resultados negativos obtenidos previamente por Adair Rodríguez. La fig. 13 muestra una ligera pendiente y actividad específica ($\approx 10\%$ y $1/3$ respectivamente del control) en los cultivos a los que se les cambió de medio con suero a medio sin suero después del pase de células (\approx día 15): este arresto duró 72 o 96 horas. Al tratar de reproducir los experimentos, se encontraron las siguientes dificultades: la confluencia fue difícil de alcanzar; si bien se llegaba a un 80%, la cantidad de proteína (analizada por prueba de Bradford) era baja, y si se lograba obtener cantidad suficiente de proteína, la actividad específica era nula o demasiado baja para los

finés requeridos. Es posible que parte de la proteína se pierda durante la cosecha y durante el procesamiento de obtención de las membranas.

El resto de las condiciones probadas no conllevó actividad de la PPII. En el caso del uso de medio con suero a lo largo de todo el cultivo (no se muestran datos), si bien se observa un mayor crecimiento celular y la cantidad de proteína recuperada es elevada, los niveles de MCA liberada detectados tras la reacción enzimática fueron similares a los del control negativo. Esto sugiere que las células tienen los nutrientes necesarios para la división, pero no las señales químicas y/o contactos celulares que permiten la expresión de la PPII similar a la que se ve *in vivo*.

En el caso del cultivo sin suero a partir del primer cambio (cuarto día) y con medio sin suero durante todo el cultivo, se observaron agregados de células redondeadas –que no tardaron en despegarse de la superficie de adhesión, a pesar del tratamiento de las cajas con poli-L-lisina– y el número de células restantes dificultó alcanzar la confluencia. Lo segundo se explica por la ausencia de suero, sin el cual las células no reciben los factores de división. Lo primero puede deberse al daño provocado al momento de disociar el tejido o, incluso, a una composición inadecuada de los suplementos añadidos. Lo que se observa en estos cultivos se asemeja de algún modo con los datos obtenidos por el grupo de trabajo del Dr. Perelló (cultivo en medio sin suero) (De Francesco *et al.*, 2017), en los que al cuarto día de cultivo se observa alrededor de la sexta parte de la densidad inicial. En éste trabajo se reportó que, 20-30% de las células son tanicitos (no conocemos el porcentaje de tanicitos en nuestros cultivos sin suero). Como se mencionó, no se detectó actividad enzimática, a pesar de que se logró obtener una cantidad suficiente de proteína (fig. 14) juntando la cosecha de varios pozos.

En otros cultivos, como los realizados por el grupo del Dr. Prevot *et al.*, o De Seranno *et al.*, el medio sin suero se agregó una vez alcanzada una confluencia del 90% y los experimentos se realizaron dos días después. Pudiera ser conveniente no hacer la resiembra de células en los cultivos sembrados en medio sin suero desde el inicio o al cuarto día, dado que éstas se recuperan difícilmente bajo estas condiciones. En caso de que sí se haga, sería importante determinar por medio de marcadores celulares si la población celular se mantiene antes y después del pase. También sería necesario realizar pruebas de viabilidad celular al inicio del

cultivo, así como al momento de la resiembra, con el fin de determinar si los métodos de dispersión están siendo muy agresivos para la supervivencia del cultivo. Las pruebas de viabilidad pueden ser por medio de indicadores del estado de la membrana (tinción con azul de tripán, yoduro de propidio) o métodos de reflejo metabólico como los compuestos de tetrazolio (MTT) (Sittampalam *et al.*, 2004). Además, entre los grupos de trabajo mencionados, algunos utilizan enzimas de digestión como la colagenasa (Chauvet *et al.*, 1996) o métodos como la separación por medio de una malla de nylon de 80µm (Seranno *et al.*, 2004); estas alternativas pudieran mejorar los cultivos, al dañar menos las células previo a la siembra.

En conclusión, las condiciones que se probaron en estos cultivos primarios no permitieron promover la adecuada expresión de la PPII y/o completar la maduración de los tanicitos. No sólo se pierde la estructura poblacional al dispersar el tejido, sino que es posible que las células están sufriendo daños al momento de la siembra. Estos problemas podrían impedir su adherencia, el mantener interacciones intercelulares e, incluso, alterar la señalización de vías internas. Es posible que la relación intercelular, en parte dada por las proteínas de la matriz extracelular, sea necesaria para el adecuado procesamiento de la PPII. Por esto se procedió a sembrar rebanadas de EM, una preparación que preserva mejor las interacciones intercelulares.

8.2 Cultivo Organotípico

Los cultivos organotípicos se han usado como herramientas para estudios electrofisiológicos (Opitz-araya & Barria, 2011), y el estudio de características morfológicas y fisiológicas de circuitos neuronales, usándolos como modelo *in vitro* (Cho *et al.*, 2007). A pesar de contener sistemas complejos (como el hipotálamo), permiten la replicación parcial del contexto *in vivo* y las interacciones son más similares a su micro ambiente natural –ya que mantienen juntos distintos tipos celulares, con su propia matriz extracelular–(Martins *et al.*, 2016). Particularmente, trabajos recientes han permitido demostrar que los cultivos de rebanadas delgadas (alrededor de 200µm de grosor) de hipotálamo (núcleo paraventricular) mantienen

la integridad funcional, la expresión génica, la liberación de hormonas y la respuesta ante estímulos como la dexametasona (Cho *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2016).

En este trabajo, los cultivos se realizaron a partir de los protocolos de Stoney *et al.*, (2016) y House *et al.*, (1998), con algunas diferencias: las rebanadas fueron de 250µm de espesor (y no de 400µm). Esto no representa un problema pues, como lo describe Martins *et al.* (2016), los cortes de hipotálamo de 250µm son, incluso, más viables que aquellos de 350µm. El medio fisiológico en el cual se realizaron los cortes fue Hank's, similar al Gray's, empleado por Cho *et al.* (2007). El suero que se empleó fue suero fetal bovino inactivado en lugar de suero normal de caballo inactivado. Sería bueno realizar un cultivo con suero normal de caballo con el fin de descartar la relevancia de la diferencia de factores (ej. de crecimiento) presentes en los sueros.

Las rebanadas se mantuvieron en cultivo por 4 a 6 días, tiempo tras el cual se observó un ligero cambio morfológico con respecto al inicio. En cultivos similares (Cho *et al.*, 2007), el tejido sembrado mantiene la forma durante al menos dos semanas, aunque el grosor parece disminuir con los días. Esto podría indicar que las condiciones de nuestro cultivo aún no son las óptimas, y que se esté llevando a cabo un proceso de muerte celular, o bien alguna remodelación estructural.

A pesar de que el trabajo realizado por Cho *et al.* (2007) prueba la viabilidad de cultivos organotípicos –de núcleo PVN del hipotálamo– de 200µm durante tres semanas *in vitro*, sería necesario algunas pruebas que nos confirmen la viabilidad de nuestros cultivos tanto al inicio como al final. Al igual que para los cultivos primarios, podrían realizarse tinciones, o pruebas que reflejen la actividad metabólica del tejido. Otra opción, aunque menos sencilla, es la prueba de TUNEL (del inglés “Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling”), para la detección del ADN fragmentado que resulta de la apoptosis.

El ensayo por inmunofluorescencia nos permitió observar una localización cercana de los núcleos (DAPI) con los marcadores específicos de los tanicitos (vimentina y nestina), principalmente en una región determinada. Esta regionalización podría corresponder a una zona con mayor cantidad de tanicitos β (puesto que en ellos se expresa la nestina). La definición de la imagen de la rebanada es pobre bajo el microscopio de fluorescencia debido al grosor y se observa mejor en la figura 15C-E, fotografía tomada al ver el tejido en el

microscopio confocal. Se observa la morfología característica de los tanicitos (cuerpo pequeño y redondo, seguido de una proyección única y larga) y, en un gran número de células, con el empalme de los marcadores específicos en los planos X;Y, X;Z y Y;Z. Esto nos permitió confirmar la identidad de los tanicitos en los cultivos.

Finalmente, la figura 15 nos muestra la cinética enzimática de la PPII en estos cultivos en un ensayo empleando TRH- β NA como sustrato. En este experimento, los niveles de β NA – reflejo de la actividad de la PPII – son similares o hasta mayores que los del control positivo (homogenizado de membranas de corteza cerebral), igual que para la actividad específica (B). Con la finalidad de descartar la posibilidad de que la actividad observada en los cortes de hipotálamo se debiese a la PPII de neuronas – ya que se sabe que en cultivo primario hipotalámico existe una localización predominante de la PPII en neuronas (Cruz *et al.*, 1991) – se seleccionó únicamente la eminencia media y zonas adyacentes¹. Aunque fue ligeramente menor, la actividad de la PPII fue visible a lo largo del cultivo comparando con el momento de inicio, día 0 (fig. 16), tomado como un control *in vivo*, y el homogenizado de cerebro. Pudimos entonces afirmar que la actividad detectada proviene de la PPII presente en tanicitos. Además, no parece haber cambios substanciales (en particular una disminución) de la actividad a lo largo de los días de cultivo.

En estos cultivos el ensayo de actividad de la PPII se realizó obviando la extracción de proteínas de membrana, para reducir la pérdida de proteína durante la preparación de las muestras. Por lo tanto, a diferencia de todos los cultivos anteriores, en las réplicas se tomó el homogenizado del tejido y se le agregó O-fenantrolina², un inhibidor de metaloproteasas como la PPII (Sánchez *et al.*, 2013), para restar la hidrólisis del sustrato por otras enzimas.

Para confirmar que la actividad observada no es únicamente el resultado de la proteína expresada antes del establecimiento del cultivo y que los tanicitos observados mantienen la maquinaria de transcripción activa, se extrajo el ARNm y se realizó una RT-PCR para la PPII, PPII*, TRH y ciclofilina (este último como control interno). Los resultados muestran que el mensajero, tanto de la PPII completa y la PPII truncada (fig. 19), como de TRH, se encuentra a los 4 y 6 días de cultivo; de manera notable se observó que los niveles de los ARNm de la

¹ Posiblemente parte del núcleo arcuato y tanicitos α , presentes en las paredes laterales del tercer ventrículo.

² La concentración necesaria para inhibir al menos el 90% de la actividad se estableció previamente.

PPII y PPII* muestran una tendencia a incrementar a lo largo del cultivo. En conjunto, los datos sugieren que la señalización que regula la expresión de la PPII se mantiene en rebanadas de EM, y que por lo menos parte de la actividad de la PPII es consecuencia de la transcripción del gen durante el cultivo.

En análisis detallados del patrón de expresión de los componentes del sistema de señalización de TRH (TRH; TRH-R1 y 2; PPII), se observó que el mensajero de la TRH es abundante en el núcleo del arcuato y ausente en la parte ventral del tercer ventrículo (Heuer *et al.*, 2000). A pesar de la selección de tejido que se hizo al momento de sembrar las rebanadas de EM, es posible que estén presentes también células provenientes del núcleo del arcuato. Esto explicaría la presencia del ARNm de TRH en los cultivos. No es despreciable la posibilidad de que las neuronas que producen el mensajero de la TRH en el arcuato puedan llevar a cabo una función en el hipotálamo mediobasal, a pesar de que ésta se desconozca. El análisis (hecho por el M. en C. Adair Rodríguez) de los resultados obtenidos por Campbell *et al.*, en 2017, muestra que el receptor de la TRH está presente en los tunicitos β de la eminencia media, lo cual permite considerar esta posibilidad. De hecho, se mostró recientemente que las neuronas TRHérgicas del PVN controlan *in vivo* la actividad de la PPII en los tunicitos a través del receptor R1 (Müller-Fielitz *et al.*, 2017), por lo que existe la posibilidad que un efecto análogo ocurra si las neuronas TRHérgicas del arcuato proyectan hacia la eminencia media.

Una vez estandarizados los cultivos, se realizó el experimento para analizar el efecto de las hormonas tiroideas sobre la enzima. A pesar de que los resultados no son muy claros, y de que no se puede decir con certeza cuál es la respuesta (puesto que el número de repeticiones es bajo), se pueden observar cambios notables en la actividad al alterar las concentraciones de TH: al privar el medio de hormonas tiroideas al segundo día de cultivo y restablecerlo con T3³, se percibe una tendencia a disminuir la actividad (fig. 17), en comparación con el control con suero (tanto en el experimento A como en el B, el control muestra el doble de actividad). El resultado no es extraño, porque los niveles de TH en el suero son mayores a $1 \times 10^{-8} M$. Al agregar T3 al medio con suero se observó un ligero incremento en la actividad de la PPII. Esto es coherente con los resultados *in vivo* de Sánchez *et al.* 2009, en los que se observa

³ La concentración de T3 corresponde a $1 \times 10^{-8} M$

que, *in vivo*, la hormona T4 tiene un efecto positivo en la regulación de la actividad de la PPII. Es posible que, al privar de T3 el medio de cultivo, la actividad de la PPII haya disminuido y que el restablecimiento con T3 a una concentración de $1 \times 10^{-8} M$ no haya sido suficiente para normalizar la actividad.

Un dato difícil de interpretar es el del incremento de actividad en un medio desprovisto de TH. En la figura 17B se observa una actividad mayor con un medio sin TH en comparación con el medio suplementado con T3 (pozo SFB+T3). Es posible que el tratamiento del suero con la resina AG®1-X8 remueva sustancias adicionales con efectos regulatorios sobre la PPII, pues no es específico para hormonas tiroideas. Se trata de una resina de intercambio iónico que posiblemente esté interactuando con otras sustancias de carga similar a la de las TH. Además, el experimento con la condición “Sin TH” solo se realizó una vez, por lo cual sería prudente repetirlo.

Dado que la actividad enzimática se detectó en los cultivos organotípicos pero no en los primarios, es posible que éstos carezcan de interacciones célula-célula que podrían ser esenciales para la expresión o procesamiento adecuado del mensajero de la PPII completa. Los tanicitos llevan a cabo distintas funciones que dependen de, por ejemplo, proteínas unidas a la membrana o a la matriz extracelular, como es el caso de su capacidad para mantener vivos distintos tipos celulares (Chauvet *et al.*, 1996). También se ha visto que algunas de sus funciones dependen del estado de su citoesqueleto, es decir, que sean capaces de inhibir o no la secreción de sustancias de terminaciones neuronales en función de si sus procesos están retraídos o no (Prevot *et al.*, 2003). Se sabe también que sustancias liberadas por células endoteliales son capaces de modificar la estructura de estos procesos, y que “células endoteliales y gliales interactúan para regular la actividad neuronal” (De Seranno *et al.*, 2004). Sabiendo que el modelo de regulación de la concentración de TRH liberado al sistema porta-hipofisiario por parte de la PPII de los tanicitos se asemeja a esta descripción, ¿podría la ausencia de señales provenientes de células con las que, *in vivo*, se mantiene una interacción repercutir en la estructura de los procesos o vías de señalización de tal modo que se modifique el procesamiento del ARNm de la PPII (favoreciendo la expresión de la PPII*)?

Basándose en análisis de secuenciación, se ha estimado que en el 90% de los genes se llevan a cabo procesamientos por splicing alternativo (Luco *et al.*, 2012). En el sistema nervioso

central los efectos de este procesamiento post-transcripcional son altamente visibles y afectan su fisiología y desarrollo (Grabowski & Black, 2001). Se sabe que la maquinaria responsable responde a la interacción de los factores de splicing con el pre-RNA mensajero (proteínas SR -S de serina y R de arginina-, ribonucleoproteínas nucleares pequeñas o snRNPs, enhancers silenciadores etc.), pero también a señales y factores externos que influyen en la selección de los sitios de splicing (Shin & Manley, 2004). Estos son específicos de tejidos o tipos celulares y varían durante el desarrollo, pero se sabe también que otros parámetros como la localización de los factores de splicing, hormonas, señales despolarizadoras y factores de crecimiento afectan el procesamiento del ARNm (Grabowski & Black, 2001; Han *et al.*, 2007). Es posible, entonces, que las interacciones célula-célula también puedan participar en la regulación del splicing alternativo. Muchos de los estudios que se han hecho con cultivos celulares (en cortes o primarios) han llevado a los investigadores a percatarse de que las condiciones de cultivo (sin o con suero) pueden afectar el patrón de expresión y diferenciación celular, y que la proporción de isoformas puede variar *in vitro* por la ausencia de interacciones célula-célula o por factores solubles, dado que el patrón de expresión de algunas isoformas se reestablece en cultivos mixtos (Campagnoni & Macklin, 1988).

9.0 Conclusiones

El patrón natural de expresión de las isoformas de la PPII en la eminencia media *in vivo* (PPIIc > PPII*) no se restauró en cultivos primarios arrestados con un medio sin suero adicionado con distintos suplementos. Esto coincidió con ausencia de actividad de la PPII, a diferencia del resultado positivo en los cultivos organotípicos. Es probable entonces que exista alguna señal proveniente de la interacción con otras células que sea necesaria para el adecuado procesamiento del mensajero de la PPII, señal que se pierde durante la dispersión de las células.

Estos resultados sugieren que el cultivo organotípico es un buen modelo para estudiar la regulación de la actividad de la PPII *in vitro*. Es posible realizar cultivos de rebanadas de eminencia media que conserven la identidad de los tanicitos, la expresión y actividad

enzimática de la PPII y que además responden a las hormonas tiroideas tal como ocurre *in vivo*.

9.1 Perspectivas

Recientemente, en el laboratorio se detectó actividad de la PPII en cultivos primarios tratados con papaína en lugar de tripsina al momento de la dispersión celular (resultados obtenidos por Abraham López, tesis en proceso). A estos cultivos no se les realizó un pase celular, y se sembraron en condiciones sin suero. Esto está de acuerdo con la suposición de que el daño ocasionado a las proteínas de membrana altera de manera directa o indirecta la expresión de la PPII. Por lo tanto, estas nuevas condiciones experimentales podrían usarse como modelo en conjunto con el cultivo organotípico para identificar la importancia de las interacciones paracrinas en la regulación de la actividad y expresión de la PPII de tanicitos *in vitro*.

En el caso del cultivo organotípico se debe confirmar que las condiciones de cultivo sean las óptimas, por medio de mediciones de la viabilidad. También será necesario realizar más pruebas para determinar el estado fisiológico de los tanicitos.

10.0 Referencias

- Altman, J., & Bayer, S. A. (1978). Development of the Diencephalon in the Rat. *J. Comp. Neur.*, 182, 945–972.
- Balland, E., Dam, J., Langlet, F., Caron, E., Steculorum, S., Messina, A., ... Umr, I. (2014). NIH Public Access. *Cell Metabolism*, 19(2), 293–301.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.015>.Hypothalamic
- Bennett, L., Yang, M., Enikolopov, G., & Iacovitti, L. (2009). NIH Public Access. *Mol Cell Neuroscience*, 41(3), 337–347.
<https://doi.org/10.1016/j.mcn.2009.04.007>.Circumventricular
- Bolborea, M., Helfer, G., Ebling, F. J. P., & Barrett, P. (2015). Dual signal transduction pathways activated by TSH receptors in rat primary tanycyte cultures. *Journal of*

- Molecular Endocrinology*, 54(3), 241–250. <https://doi.org/10.1530/JME-14-0298>
- Chauvet, N., Privat, A., & Alonso, G. (1996). Aged median eminence glial cell cultures promote survival and neurite outgrowth of cocultured neurons. *Glia*, 18(3), 211–223. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199611\)18:3<211::AID-GLIA5>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199611)18:3<211::AID-GLIA5>3.0.CO;2-1)
- Chávez-Gutiérrez, L., Bourdais, J., Aranda, G., Vargas, M. A., Matta-Camacho, E., Ducancel, F., ... Charli, J. L. (2005). A truncated isoform of pyroglutamyl aminopeptidase II produced by exon extension has dominant-negative activity. *Journal of Neurochemistry*, 92(4), 807–817. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02916.x>
- Chávez-Gutiérrez, L., Matta-Camacho, E., Osuna, J., Horjales, E., Joseph-Bravo, P., Maigret, B., & Charli, J. L. (2006). Homology modeling and site-directed mutagenesis of pyroglutamyl peptidase II: Insights into omega- versus aminopeptidase specificity in the M1 family. *Journal of Biological Chemistry*, 281(27), 18581–18590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601392200>
- Cho, E. S., Lee, S. Y., Park, J.-Y., Hong, S.-G., & Ryu, P. D. (2007). Organotypic slice culture of the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *Journal of Veterinary Science*, 8(1), 15–20.
- Cruz, C., Charli, J., Vargas, M. A., & Joseph-bravo, P. (1991). Neuronal Localization of Pyroglutamate Aminopeptidase II in Primary Cultures of Fetal Mouse Brain. *Journal of Molecular Endocrinology*, 56(5), 1594–1601.
- De Francesco, P. N. De, Castrogiovanni, D., Uriarte, M., Frassa, V., Agosti, F., Raingo, J., & Perello, M. (2017). A simple strategy for culturing morphologically-conserved rat hypothalamic tanycytes. *Cell Tissue Res*, 369(2), 369–380. <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2608-x>
- Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocrine Reviews*, 35(2), 159–194. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1087>
- Gabrion, J. B., Herbute, S., Bouille, C., Maurel, D., Kuchler-Bopp, S., Laabich, A., & Delaunoy, J.-P. (1998). Ependymal and Choroidal Cells in Culture : Characterization

- and Functional Differentiation. *Microscopy Research and Technique*, 157, 124–157.
- Gabrion, J., Peraldi, S., Faivre-Bauman, A., Klotz, C., Ghandour, M. S., Paulin, D., ... Tixier-Vidal, A. (1988). CHARACTERIZATION OF EPENDYMAL CELLS IN HYPOTHALAMIC AND CHOROICAL PRIMARY CULTURES. *Neuroscience*, 24(3), 993–1007.
- Goodman, T., & Hajihosseini, M. K. (2015). Hypothalamic tanycytes-masters and servants of metabolic, neuroendocrine, and neurogenic functions. *Frontiers in Neuroscience*, 9(OCT), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00387>
- Grabowski, P. J., & Black, D. L. (2001). Alternative RNA splicing in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 65, 289–308.
- Guo, R., Sakamoto, H., Sugiura, S., & Ogawa, M. (2006). Endothelial Cell Motility Is Compatible With Junctional Integrity. *Journal of Cellular Physiology*, 211(2), 327–335. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Han, F., Gilbert, J. R., Harrison, G., Adams, C. S., Freeman, T., Tao, Z., ... Hickok, N. J. (2008). Transforming Growth Factor β 1 regulates fibronectin isoform expression and splicing factor SRp40 expression during ATDC5 chondrogenic maturation. *Experimental Cell Research*, 313(8), 1518–1532.
- Heike, H., Dchafer, M. k. -h., Donnell, D. O., Walker, P., & Bauer, K. (2000). Expression of Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor 2 (TRH-R2) in the. *The Journal of Comparative Neurology*, 428, 319–336.
- Heuer, H., Ehrchen, J., Bauer, K., & Scha, M. K. H. (1998). hormone-degrading ectoenzyme in the rat central nervous system and pituitary gland. *European Journal of Neuroscience*, 10, 1465–1478.
- House, S. B., Thomas, A., Kusano, K., & Gainer, H. (1998). Stationary Organotypic Cultures of Oxytocin and Vasopressin Magnocellular Neurones from Rat and Mouse Hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 10, 849–861.
- Joseph-Bravo, P., Jaimes-Hoy, L., & Charli, J.-L. (2015). Regulation of TRH neurons and energy homeostasis-related signals under stress. *Journal of Endocrinology*, 224(3),

139–159. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0593>

Kelly, J. A., Slator, G. R., Tipton, K. F., Williams, C. H., & Bauer, K. (1999). Development of a Continuous , Fluorometric Coupled Enzyme Assay for Thyrotropin-Releasing, *202*, 195–202.

Lazcano, I., Cabral, A., Uribe, R. M., Jaimes-Hoy, L., Perello, M., Joseph-Bravo, P., ... Charli, J. L. (2015). Fasting enhances pyroglutamyl peptidase II activity in tanycytes of the mediobasal hypothalamus of male adult rats. *Endocrinology*, *156*(7), 2713–2723. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1885>

Lee, D. a, Bedont, J. L., Pak, T., Wang, H., Song, J., Miranda-Angulo, A., ... Blackshaw, S. (2012). Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nature Neuroscience*, *15*(5), 700–704. <https://doi.org/10.1038/nn.3079>

López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, *19*(7), 418–427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>

Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R., & Misteli, T. (2012). Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing Reini. *Cell*, *144*(1), 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.11.056>.Epigenetics

Martins, J. P., Alvez, C. J., Neto, E., & Lamghari, M. (2016). Communication from the periphery to the hypothalamus through the blood – brain barrier : An in vitro platform. *International Journal of Pharmaceutics*, *499*(1–2), 119–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.12.058>

Morton, G. J., Meek, T. H., & Schwartz, M. W. (2014). Neurobiology of food intake in health and disease. *Nature Reviews. Neuroscience*, *15*(6), 367–78. <https://doi.org/10.1038/nrn3745>

Opitz-araya, X., & Barria, A. (2011). Organotypic Hippocampal Slice Cultures, (February), 5–8. <https://doi.org/10.3791/2462>

Orellana, J. A., Sáez, P. J., Cortés-Campos, C., Elizondo, R. J., Shoji, K. F., Contreras-

- Duarte, S., ... García, M. A. (2012). NIH Public Access. *Glia*, 60(1), 53–68.
<https://doi.org/10.1002/glia.21246>.Glucose
- Pilz, G., Shitamukai, A., Reillo, I., Pacary, E., Schwausch, J., Stahl, R., ... Borrell, V. (2013). Amplification of progenitors in the mammalian telencephalon includes a new radial glial cell type. *Nature Communications*, 2125, 1–11.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3125>
- Prevot, V., Cornea, A., Mungenast, A., Smiley, G., & Ojeda, S. R. (2003). Activation of erbB-1 Signaling in Tanycytes of the Median Eminence Stimulates Transforming Growth Factor α 1 Release via Prostaglandin E 2 Production and Induces Cell Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, 23(33), 10622–10632.
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., Pastor, F. E., Peláez, B., Peña, P., Peruzzo, B., & Amat, P. (2005). Hypothalamic Tanycytes : A Key Component of Brain – Endocrine Interaction. *International Review of Cytology*, 247(5), 89–164.
[https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)47003-5](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)47003-5)
- Saito, Y., & Takahashi, K. (2002). Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *European Journal of Biochemistry*, 269, 5746–5751.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03298.x>
- Sánchez, E., Charli, J.-L., & Lechan, R. M. (2013). Pyroglutamyl-Peptidase II. In N. D. Rawlings & G. S. Salvesen (Eds.), *Handbook of Proteolytic Enzymes* (3th ed., pp. 414–419). Oxford: Academic Press.
- Sanchez, E., Vargas, M. A., Singru, P. S., Pascual, I., Romero, F., Fekete, C., ... 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(5), 2283–2291. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1643>
- Santini, F., Marzullo, P., Rotondi, M., Ceccarini, G., Pagano, L., Ippolito, S., ... Biondi, B. (2014). Mechanisms in endocrinology: The crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: Signal integration in health and disease. *European Journal of Endocrinology*, 171(4), R137–R152. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0067>

- Schauder, B., Schomburg, L., Köhrle, J., & Bauer, K. (1994). Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, *91*, 9534–9538.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Jr, D. P., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature*, *404*, 661–671.
<https://doi.org/10.1038/35007534>
- Seranno, S. De, Estrella, C., Loyens, A., Cornea, A., Ojeda, S. R., Beauvillain, J., & Prevot, V. (2004). Vascular Endothelial Cells Promote Acute Plasticity in Ependymogial Cells of the Neuroendocrine Brain. *The Journal of Neuroscience*, *24*(46), 10353–10363.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3228-04.2004>
- Shin, C., & Manley, J. L. (2004). CELL SIGNALLING AND THE CONTROL OF PRE-mRNA SPLICING. *Molecular Cell Biology*, *5*, 727–738.
<https://doi.org/10.1038/nrm1467>
- Silverman, A.-J., Knigge, K. M., Ribas, J. L., & Sheridan, M. N. (1973). Transport Capacity of Median Eminence : III. Amino Acid and Thyroxine Transport of Organ-Cultured Median Eminence. *Neuroendocrinology*, *11*, 107–118.
- Sittampalam, G. S., Coussens, N. P., Brimacombe, K., Grossman, A., Arkin, M., Auld, D., ... Terry, M. (2004). *Assay Guidance Manual*. (L. MInor, V. Lemmon, A. Napper, J. M. Peltier, H. Nelson, & N. Gal-Edd, Eds.). Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Vargas, M. A., Herrera, J., Uribe, R. M., Charli, J., & Joseph-bravo, P. (1992). Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain , adenohipophysis and pancreas. *Developmental Brain Research*, *66*, 251–256.
- Villette, S., Bermano, G., Arthur, J. R., & Hesketh, J. E. (1998). Thyroid stimulating hormone and selenium supply interact to regulate selenoenzyme gene expression in thyroid cells (FRTL-5) in culture. *Letters*, *438*, 81–84.
- Wittmann, G., Farkas, E., Szilvásy-szabó, A., Gereben, B., & Fekete, C. (2016). Variable proopiomelanocortin expression in tanycytes of the adult rat hypothalamus and

pituitary stalk. *The Journal of Comparative Neurology*, 524, 411–441.
<https://doi.org/10.1002/cne>.