



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**ANÁLISIS DE LOS RNA MENSAJEROS QUE CODIFICAN  
PARA TRH, VGLUT2 O GAD67 EN EL NPV DE RATONES  
CON AYUNO PROLONGADO.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:  
HAYDE SANDOVAL MORENO**

**TUTOR:  
EDITH SÁNCHEZ JARAMILLO**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. 2022**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**                      **Profesor:** ZAMBRANO GONZÁLEZ ELENA  
**VOCAL:**                                      **Profesor:** PEDRAZA CHAVERRI JOSÉ  
**SECRETARIO:**                      **Profesor:** SÁNCHEZ JARAMILLO EDITH (ASESORA)  
**1er. SUPLENTE:**                      **Profesor:** PLASENCIA DE LA PARRA FRANCISCO  
  JAVIER  
**2° SUPLENTE:**                      **Profesor:** VÁZQUEZ MARTÍNEZ EDGAR RICARDO

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE  
PSIQUIATRÍA RAMÓN DE LA FUENTE MUÑIZ.**

**ASESOR DEL TEMA:**



---

**SÁNCHEZ JARAMILLO EDITH**

**SUSTENTANTE:**



---

**HAYDE SANDOVAL MORENO**

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, bajo la dirección de la Dra. Edith Sánchez Jaramillo. El trabajo fue financiado por el Fondo para la Investigación del Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz proyectos Conacyt 107109, INPRFM NC19110.0 (ESJ).

# ÍNDICE GENERAL

## 1. INTRODUCCIÓN

<b>1.1 Antecedentes.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Organización y diversidad funcional de neuronas de la TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo.....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Elementos que regulan la biosíntesis de la TRH en el NPV.....</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Conectividad de neuronas de la TRH hipofisiotrópicas.....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Interacción del núcleo paraventricular y el núcleo arcuato durante la ingesta .....</b>	<b>6</b>
1.5.1 Neuronas de primer orden en el Arcuato .....	6
1.5.2 Neuronas de segundo orden en el NPV .....	9
<b>1.6 Actividad del eje adrenal durante el ayuno.....</b>	<b>10</b>
<b>1.7 GABA.....</b>	<b>10</b>
<b>1.8 Glutamato .....</b>	<b>13</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>15</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>15</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>17</b>
<b>6. METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
<b>6.1 Animales.....</b>	<b>21</b>
<b>6.2 Material y agua libre de ARNasas .....</b>	<b>21</b>

<b>6.3 Obtención de tejidos perfundidos.....</b>	<b>22</b>
<b>6.4 Obtención de tejidos congelados.....</b>	<b>22</b>
<b>6.5 Preparación de tejidos para hibridación.....</b>	<b>23</b>
<b>6.6 Linearización y purificación de los plásmidos que contienen la secuencia complementaria para el ARNm de la TRH, el VGluT2 y la GAD67. .....</b>	<b>23</b>
<b>6.7 Purificación del ADN de los plásmidos linearizados.....</b>	<b>25</b>
<b>6.8 Gel de electroforesis. ....</b>	<b>26</b>
<b>6.9 Análisis de los ARNm de la TRH, el VGluT2 y la GAD67 en el NPV por hibridación in situ.....</b>	<b>27</b>
6.9.1 Transcripción in vitro. Marcaje de sondas de ARN complementarias al ARNm de la TRH, el VGluT2 y la GAD67.....	<b>27</b>
6.9.2 Pre-hibridación y fijación de tejidos perfundidos.....	<b>29</b>
6.9.3 Pre-hibridación y fijación de tejidos congelados.....	<b>29</b>
6.9.4 Mezcla de hibridación.....	<b>30</b>
6.9.5 Hibridación in situ radiactiva ( <sup>35</sup> S) o fluorescente (FISH) para la TRH, el VGluT2 y la GAD67 .....	<b>30</b>
6.9.6 Lavados post-hibridación.....	<b>31</b>
6.9.7 Solución de bloqueo e incubación con un anticuerpo anti digoxigenina- fosfatasa alcalina.....	<b>31</b>
6.9.8 Revelado de láminas .....	<b>32</b>
6.9.9 Revelado de láminas con anti digoxigenina-fosfatasa alcalina (Ab dig- PA) .....	<b>33</b>

6.9.10 Revelado de señal con Digoxigenina, Tiramida-DMSO-Alexa 488..	34
6.9.11 Emulsión de laminillas marcadas con <sup>35</sup> S.....	34
6.9.12 Revelado de las laminillas emulsionadas, marcadas con <sup>35</sup> S.....	35
6.9.13 Adquisición y cuantificación de imágenes de los tejidos hibridados	36
<b>7. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
7.1 Distribución del ARNm de la TRH por ISH radiactiva en el NPV de animales con ayuno de 36, 44 o 50 h .....	38
7.2 Cuantificación del número total de células positivas al ARNm de la TRH detectado con <sup>35</sup> S-UTP en el NPV de animales con ayuno de 36, 44 o 50 h .....	40
7.3 Determinación de la concentración de la sonda de digoxigenina empleada para visualizar los ARNs mensajeros de la TRH, el VGlut2 y la GAD67.....	42
7.4 Detección de los ARNm del VGlut2 y la GAD67 por ISH, empleando dig-UTP/fosfatasa alcalina en el NPV de ratonas expuestas a un ayuno de 36 h .....	42
7.5 Detección del ARNm de la TRH empleando dig-UTP/ Tiramida-DMSO-Alexa 488 en el NPV de ratones expuestos a un ayuno de 36 h.....	44
7.6 Detección de los ARNm del VGlut2 y la GAD67 empleando dig-UTP/ Tiramida-DMSO-Alexa 488, en el NPV de ratones expuestos a un ayuno de 36 h .....	46
<b>8. DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>9. CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>10. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>

<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>57</b>
<b>12. REFERENCIAS .....</b>	<b>63</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** En el núcleo Arcuato, las neuronas del NPY/AgRP son reguladas positivamente por la grelina y negativamente por la leptina, por el contrario, las neuronas del POMC/CART/ $\alpha$ -MSH son reguladas negativamente por la grelina y positivamente por la leptina. .... **8**
- Figura 2.** Componentes de la síntesis y el transporte del GABA en las sinapsis. .. **12**
- Figura 3.** Diseño experimental utilizado para la identificación y el análisis de los ARNs mensajeros que codifican para la TRH, la GAD67 y el VGluT2, en el NPV de ratones adultos sometidos a un ayuno prolongado. .... **19**
- Figura 4.** Micrografías en campo oscuro de cortes coronales representativos del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) en dirección rostro- caudal, de ratones macho de la cepa C57/BL6/JN en los distintos grupos experimentales: control (ad libitum), ayuno de 36, 44 y 50 h. .... **39**
- Figura 5.** La gráfica representa el número total de células positivas al ARNm de la TRH marcado con  $^{35}\text{S}$   $\alpha$ -UTP en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) de cerebros de ratones macho de la cepa C57/BL6/JN en animales control (agua y comida ad libitum) y en los grupos experimentales con ayuno de 36, 44 o 50 h. ... **40**
- Figura 6.** Efecto del ayuno sobre el número de células con mayor y menor concentración de ARNm de la TRH en las neuronas hipofisiotrópicas del NPV. .... **41**
- Figura 7.** Distribución de los ARNs mensajeros para el VGluT2 y la GAD67 en el NPV de ratón según el Allen Mouse Brain Atlas. .... **43**
- Figura 8.** Distribución del ARNm de la TRH en el NPV de ratones con 36 h de ayuno. La señal del ARN se detectó con un Ab dig-POD y Tiramida-DMSO-Alexa 488. ... **45**
- Figura 9.** Micrografías representativas de la zona media del NPV de ratones de la cepa C57/BL6/JN sometidos a 36 h de ayuno y control (Ad libitum). .... **46**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Número de animales en los diferentes grupos experimentales empleados para las hibridaciones <i>in situ</i> .....	<b>21</b>
<b>Tabla 2.</b> Enzimas de restricción y soluciones amortiguadoras empleadas para la digestión de plásmidos.....	<b>24</b>
<b>Tabla 3.</b> Linearización de los plásmidos utilizados para la ISH del VGluT2, la GAD67 y la TRH.....	<b>25</b>
<b>Tabla 4.</b> ARN polimerasas utilizadas para la transcripción <i>in vitro</i> de los ARNc para el VGluT2, la GAD67 o la TRH.....	<b>28</b>
<b>Tabla 5.</b> Marcaje de sondas para el VGluT2, la GAD67 o la TRH con <sup>35</sup> S-UTP o dig-UTP y su conjugado a revelar (PA o FISH), en los diferentes grupos experimentales de ayuno y control.....	<b>33</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico	GC	Glucocorticoides
AgRP	Péptido Relacionado con Agutí	HA	Hipófisis anterior
ARN	Ácido ribonucleico	HHT	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	HL	Hipotálamo lateral
BDNF	<i>Factor neurotrópico derivado del cerebro</i>	HMB	Hipotálamo Mediobasal
CART	Transcrito regulado por Cocaína y Anfetamina	HT	Hormona tiroidea
P-CREB	Proteína de Unión al Elemento de Respuesta a AMP cíclico	ISH	Hibridación <i>in situ</i>
D2	Deiodinasa de Iodotironina tipo 2	NA	Noradrenalina
Dex	Dexametasona	NDM	Núcleo Dorsomedial
DTT	DL-Dithiothreitol	NPV	Núcleo Paraventricular del Hipotálamo
EDTA	Etilen-diamino-tetraacético	NPY	Neuropéptido Y
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente	PBS	Amortiguador salino de fosfatos
GABA	Ácido gamma aminobutírico	PC1	Prohormona Convertasa 1
GAD	Glutamato descarboxilasa	PC2	Prohormona Convertasa 2
GAD65	Glutamato Descarboxilasa isoforma 65	PFA	Paraformaldehído
GAD67	Glutamato Descarboxilasa isoforma 67	POMC	Pro-opiomelanocortina
GALP	Péptido Similar a Galanina	PRL	Prolactina
		SDS	Dodecil sulfato de sodio
		SNC	Sistema nervioso central

SSC Amortiguador de citrato de sodio

T.A Temperatura ambiente

T3 Triyodotironina

T4 Tiroxina

TBE Tris borato EDTA

TEA Trietanolamina

TR Receptor de hormona tiroidea

TRH Hormona Liberadora de  
Tirorotropina

TSA Tiramida estreptavidina

TSH Hormona Estimulante de la  
Tiroides o Tirotropina

VGlut's Transportadores  
vesiculares de glutamato

VGlut1 Transportador vesicular  
de glutamato tipo 1

VGlut2 Transportador vesicular de  
glutamato tipo 2

VGlut3 Transportador vesicular de  
glutamato tipo 3

$\alpha$ -MSH Alfa-Hormona Estimulante  
de Melanocitos o Melanocortinas

## RESUMEN

---

Para los mamíferos, la energía que se obtiene de los alimentos es de vital importancia para subsistir. La regulación de la ingesta implica adquirir, transformar, repartir y utilizar la energía de los nutrientes, con el fin de mantener la homeostasis en el organismo y el metabolismo energético en condiciones óptimas. En la actualidad se conocen moléculas orexigénicas y anorexigénicas ligadas a la respuesta endócrina de la ingesta, que desencadenan mecanismos fisiológicos para regular las necesidades del organismo; sin embargo, esta red de señalización es compleja y no está del todo dilucidada. Uno de los principales sistemas de regulación endocrina que responde a las demandas energéticas y contribuye a regular la homeostasis, es el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). Este eje se rige por neuronas que residen en la zona parvocelular medial del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), que sintetizan y liberan a la hormona liberadora de la tirotropina (TRH) de terminales nerviosas que inciden en la eminencia media (EM). La TRH que se libera de la EM hacia el sistema portal-hipofisario, activa la síntesis y la liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) de la hipófisis anterior (HA) que, a su vez, activa la síntesis y la liberación de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) de la glándula tiroides. Las hormonas T3 y T4 regulan negativamente a la TSH de la HA y a la TRH del NPV, retroalimentando con ello la actividad del eje HHT. En condiciones metabólicas adversas como el ayuno prolongado, la actividad del eje HHT disminuye significativamente, tanto a nivel central (NPV y EM) como a nivel periférico (HA, circulación general). No obstante, la actividad residual es necesaria para mantener la homeostasis energética y la vida. El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la respuesta de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV en ratones con ayuno prolongado. El análisis del número de células positivas al ARN mensajero (ARNm) de la TRH con señal abundante o menor señal en animales que cursaron un ayuno de 36, 44 o 50 h, demostró que 36 h de ayuno, son suficientes para disminuir significativamente la concentración del ARNm de la TRH en el NPV hipofisiotrópico y que esta inhibición, prevalece en el grupo de 44 h. La inhibición ocurrió principalmente en una subpoblación de neuronas de la zona medial-posterior y tanto la zona medial como

la medial-posterior, contuvieron una población de neuronas TRH que no fue susceptible a la inhibición mediada por el ayuno. Adicionalmente, se determinó si la concentración del ARNm del transportador 2 de glutamato (VGluT2) o el de la enzima Glutamato descarboxilasa isoforma 67 (GAD67), se modificaba en respuesta al ayuno prolongado en el NPV de ratones con inhibición significativa de la concentración del ARNm de la TRH. Nuestros datos señalan que tanto el ARNm del VGluT2 como el de la enzima GAD67, aumentan en el NPV en respuesta a un ayuno prolongado, por lo que se concluye que la activación de ambos sistemas de neurotransmisión es necesaria para mantener la homeostasis durante el balance energético negativo originado por la condición de ayuno.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

La hormona liberadora de la tirotropina (TRH) desempeña un papel fundamental en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (HHT). Las neuronas que controlan la actividad del eje HHT residen en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y sintetizan y liberan a la TRH de terminales nerviosas que inciden en la eminencia media (EM) del hipotálamo mediobasal (HMB). La TRH liberada de la EM alcanza a sus células blanco en la hipófisis anterior (HA), a través del sistema portal capilar que conecta la EM con la HA. La TRH activa la síntesis y liberación de la TSH en la hipófisis anterior y esta a su vez, la síntesis y liberación de las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) de la glándula tiroides; la T3 y la T4 inhiben la síntesis de la TSH de la HA y la de la TRH en el NPV, retroalimentando negativamente la actividad del eje HHT (Fekete & Lechan, 2014).

Al menos dos poblaciones de neuronas TRHérgicas coexisten en el NPV, las que sintetizan a la TRH no hipofisiotrópica, que se localizan en las subdivisiones parvocelular anterior, dorsal y ventral del núcleo, y las que sintetizan a la TRH hipofisiotrópica, que en el ratón se localizan en las subdivisiones parvocelular medial y periventricular del NPV (Kadar y cols., 2010). Sólo las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas responden al control retroalimentador negativo de la hormona tiroidea de la circulación (Dyess y cols., 1988), aunque también responden a estímulos como cambios de temperatura (exposición al frío) y a la succión, que aumentan la biosíntesis de la TRH en todo el NPV (Arancibia, Rage, Astier, & Tapia-Arancibia, 1996; Sanchez y cols., 2001) o al ayuno prolongado o la infección bacteriana, que disminuyen la biosíntesis de la TRH (Kakucska y cols., 1994; Legradi, Emerson, Ahima, Flier, & Lechan, 1997). Estos efectos se deben en gran parte a las aferencias que reciben las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas tanto de otros núcleos hipotalámicos como del tallo cerebral, pero también a la influencia de las hormonas provenientes de la periferia como la leptina, la corticosterona y probablemente la grelina (Dos-Santos, Reis, Perello, Ferguson, & Mecawi, 2019;

Kakucska, Qi, & Lechan, 1995; Legradi y cols., 1997). La producción local de la T3 en los tanicitos de la EM por la desiodasa 2 (Lechan & Fekete, 2005) o la inactivación de T3 por la desiodasa 3 de astrocitos en el hipotálamo mediobasal (Kallo y cols., 2012), así como la regulación de la cantidad de la TRH bioactiva que ingresa al sistema portal hipofisario (Sanchez y cols., 2009) y la presencia de transportadores de HT en los tanicitos (Wittmann y cols., 2015), son algunos elementos adicionales que forman parte integral del control central del eje HHT.

Este trabajo se centra en el estudio de la regulación de la actividad de la neurona de la TRH hipofisiotrópica en respuesta a un ayuno prolongado y aborda 2 elementos adicionales que pudieran contribuir a la regulación general de la actividad del eje HHT ante una condición de balance energético negativo como es el ayuno: el análisis de la concentración del ARNm que codifica para el transportador de glutamato, VGluT2 y el del ARNm que codifica para la enzima GAD67 en el NPV de ratones C57/BL6/JN con ayuno prolongado.

## ***1.2 Organización y diversidad funcional de las neuronas TRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo***

Anatómicamente, el NPV se encuentra ubicado en los márgenes dorsales del tercer ventrículo y se divide en regiones parvocelulares y magnocelulares. El NPV parvocelular se subdivide a su vez en regiones anterior, medial, periventricular, ventral, dorsal y lateral, mientras que el NPV magnocelular en regiones anterior y posterior (Swanson & Kuypers, 1980). Las neuronas que sintetizan a la TRH están presentes en todo el NPV, pero son particularmente abundantes en las subdivisiones parvocelulares anterior, medial y periventricular (Segerson y cols., 1987).

Además de su organización anatómica, las neuronas de la TRH del NPV se subdividen en unidades funcionales distintas. Por ejemplo, solo las neuronas de la TRH de las subdivisiones parvocelulares medial y periventricular son



hipofisiotrópicas porque sus terminales proyectan a la eminencia media desde donde secretan la TRH al sistema portal hipofisario (Fekete, Mihaly, y cols., 2000). Por otro lado, las neuronas de la TRH de las subdivisiones parvocelulares anterior, dorsal y lateral, proyectan a regiones del cerebro que están implicadas en funciones autónomas como la regulación del apetito y en una variedad de funciones vegetativas (Fekete & Lechan, 2014). Algunas neuronas que sintetizan a la TRH se encuentran dispersas en la subdivisión magnocelular posterior del NPV; estas neuronas proyectan a la hipófisis posterior, pero se desconoce la función o importancia de las mismas.

Aunque las neuronas que sintetizan al péptido regulado por cocaína y anfetamina (CART), se encuentran ampliamente distribuidas en el NPV (Fekete, Mihaly, y cols., 2000), el hecho de que las neuronas de la TRH mediales y periventriculares coexpresen a CART, pero no las neuronas de la TRH de la subdivisión parvocelular anterior, hace de CART, una herramienta molecular valiosa para el estudio de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV (Fekete, Mihaly, y cols., 2000).

La heterogeneidad de las respuestas fisiológicas de las neuronas de la TRH del NPV está bien documentada (Dyess y cols., 1988; Sanchez y cols., 2001; Segerson y cols., 1987). Sólo las neuronas de la TRH de las subdivisiones parvocelulares medial y periventricular responden al hipotiroidismo primario e hipertiroidismo (Dyess y cols., 1988; Marsili y cols., 2011; Segerson y cols., 1987), al ayuno (Lechan RM, 1992) o a la succión (Sanchez y cols., 2001), mientras que el estímulo de frío activa a las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas y no hipofisiotrópicas del NPV (Sanchez y cols., 2001).

### ***1.3 Elementos que regulan la biosíntesis de la TRH en el NPV***

Las neuronas que sintetizan a la TRH en el NPV, son reguladas por una variedad de señales hormonales y neurales, que están parcialmente mediadas por elementos reguladores presentes en la región promotora del gen que codifica para

la TRH. La pro-TRH se deriva de un solo gen en todas las especies animales estudiadas y está compuesto por tres exones y dos intrones (Lechan y cols., 1986). El exón 1 codifica para el extremo 5' no traducido de su ARNm, el exón 2 para el péptido señal y el exón 3, para las cinco secuencias progenitoras repetitivas de la TRH, el extremo 3' codifica para la región no traducida de su ARNm y para la secuencia poli A. La región promotora del gen de la TRH se ubica en la región 5' río arriba del exón 1. Balkan W. y colaboradores demostraron que la región que contiene los nucleótidos -547 a +84 en el gen de la rata, confiere la actividad transcripcional *in vitro* casi por completo mientras que, una secuencia más corta, de entre + 6 a +84 nucleótidos, confiere la expresión génica tejido-específica *in vivo* (Balkan, Tavianini, Gkonos, & Roos, 1998).

La región ubicada entre -59 / -52 [TGACCTCA] en humano, rata y ratón, promueve la regulación de la retroalimentación negativa por las hormonas tiroideas T3 y T4, además de conferirle expresión basal al gen de la TRH (Hollenberg y cols., 1995; Satoh, Yamada, Iwasaki, & Mori, 1996). Así mismo, la región ubicada entre -242 / + 58, contiene un elemento susceptible a AMP cíclico (AMPC) típico [TGCCGTCA] que es activado por P-CREB y antagoniza el efecto inhibitorio de la hormona tiroidea (Cote-Velez y cols., 2005; Joseph-Bravo y cols., 1998). Varias secuencias medias para el sitio [TGTTCT] ubicadas en las posiciones -735, -560 y -210, o secuencias medias invertidas para la secuencia [GGTCCACACTCTTGT], ubicadas en las posiciones -284, -275 o -310, pudieran ser importantes para la unión de los receptores a glucocorticoides (GC) (Lee, Stewart, & Goodman, 1988), además de tener efectos tanto positivos como negativos sobre la expresión del gen de la TRH dependiendo del tiempo, de la dosis y de la presencia o ausencia de otros elementos reguladores en el medio celular (Kakucska y cols., 1995; Perez-Martinez y cols., 1998).

#### **1.4 Conectividad de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas**

Las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas reciben inervaciones densas por aferencias sinápticas que se originan principalmente de tres regiones distintas del cerebro: el núcleo arcuato hipotalámico, el núcleo dorsomedial (NDM) hipotalámico y el tallo cerebral (Fekete, Sarkar, & Lechan, 2005; Mihaly y cols., 2000; Shioda & Nakai, 1993; Wittmann, Liposits, Lechan, & Fekete, 2002). Las terminales axónicas que provienen de las neuronas del núcleo arcuato, contienen a la  $\alpha$ -MSH, al CART, al neuropéptido Y (NPY), al péptido relacionado con el aguti (AgRP, *por sus siglas en inglés: Agouti Related Peptide*) y al péptido similar a la galanina (GALP, *por sus siglas en inglés: Galanine Related Peptide*). Mientras que las aferencias de  $\alpha$ -MSH/CART establecen sinapsis asimétricas sobre las neuronas de la TRH del NPV y tienen un efecto activador sobre la biosíntesis del ARNm de la TRH (Fekete, Legradi, y cols., 2000; Fekete, Mihaly, y cols., 2000), las aferencias de NPY/AgRP establecen sinapsis simétricas que confieren efectos inhibitorios potentes sobre las neuronas de la TRH (Fekete y cols., 2001; Mihaly y cols., 2000). Las aferencias del péptido similar a la galanina (GALP, *por sus siglas en inglés: Galanine like peptide*) inciden selectivamente sobre las neuronas de la TRH del NPV anterior (Wittmann y cols., 2004), por lo que no parecen tener una función hipofisiotrópica. Las aferencias de neurotransmisores y péptidos provenientes del NDM, se desconocen casi en su totalidad pero incluyen al GABA y al glutamato (Fekete, Wittmann, Liposits, & Lechan, 2002; Wittmann, Lechan, Liposits, & Fekete, 2005). Si bien las neuronas del NDM establecen sinapsis tanto simétricas como asimétricas sobre las neuronas de la TRH parvocelulares de la zona medial, se pueden anticipar efectos inhibitorios y excitatorios; no obstante, la importancia biológica se desconoce (Fekete & Lechan, 2014). Las terminales aferentes provenientes del tallo cerebral A1, A2 y C1-C3 contienen a la epinefrina y a la norepinefrina y establecen sinapsis asimétricas sobre las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas por lo que se sugiere una acción excitatoria (Fekete, Wittmann, Liposits, & Lechan, 2004; Shioda & Nakai, 1993). Adicionalmente, los grupos C1-C3 del tallo cerebral, contienen al CART y al NPY (Fekete y cols., 2004; Wittmann y cols., 2002) que contribuyen a la inervación del CART y el NPY provenientes del arcuato sobre las neuronas de la TRH del NPV.

No obstante, la inervación de CART sobre las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV proviene principalmente del tallo cerebral y no del núcleo arcuato (Fekete y cols., 2005).

### ***1.5 Interacción del núcleo paraventricular y el núcleo arcuato durante la ingesta***

Ante un déficit energético, el eje tiroideo, el eje del crecimiento, y el eje de la reproducción, se inhiben, mientras que el eje del estrés o eje adrenal, se activa (Sainsbury & Zhang, 2012). Se ha comprobado que estos ejes se regulan ante un déficit energético de acuerdo a cambios en las concentraciones de las hormonas circulantes como la leptina y la grelina, que son detectados por neuronas de primer orden del hipotálamo, en particular por las neuronas del núcleo arcuato, que tienen receptores para estas hormonas. Las neuronas de primer orden denominadas **sistema de melanocortinas**, contienen diferentes subpoblaciones celulares que envían señales a diferentes núcleos del cerebro (neuronas de segundo orden) mediante la liberación de sus péptidos contenidos en las terminaciones nerviosas, en particular a neuronas del mismo hipotálamo que participan en la regulación del balance energético y que se localizan en el núcleo paraventricular, el núcleo dorsomedial o el hipotálamo lateral (HL) (Bouret, Draper, & Simerly, 2004; Sainsbury & Zhang, 2012).

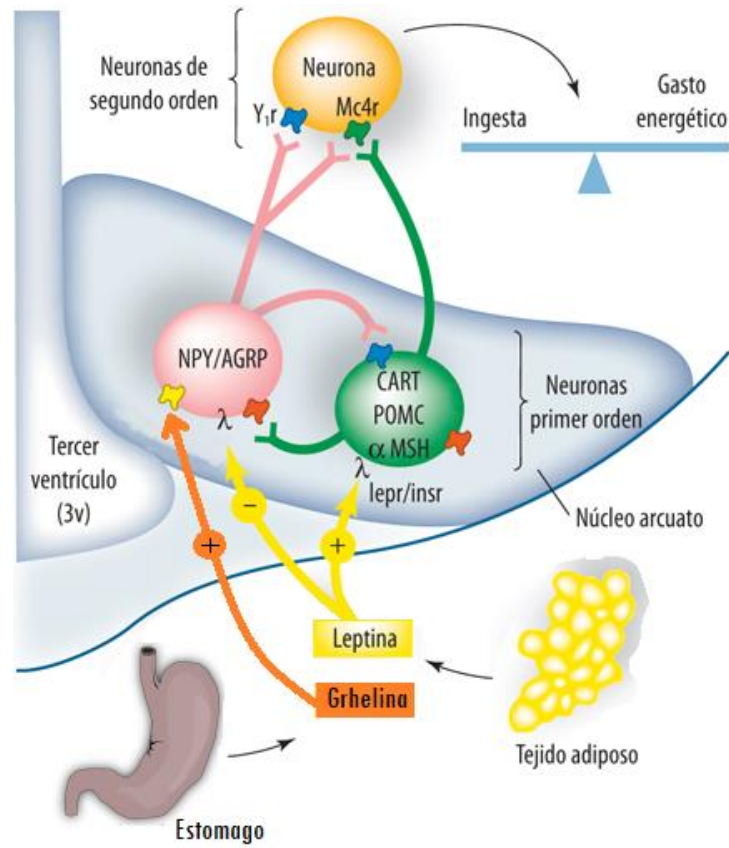
#### **1.5.1 Neuronas de primer orden en el arcuato**

El sistema de melanocortinas del arcuato, se denomina así porque uno de los péptidos (la hormona estimuladora de los  $\alpha$ -melanocitos), y sus receptores Mc3R y Mc4R (receptores de melanocortinas 3 y 4 respectivamente), participan en la regulación de este sistema. El sistema de melanocortinas está formado por dos subpoblaciones neuronales que sintetizan y liberan a los péptidos Y (NPY) y proteína relacionada con el Agouti (AgRP; neuronas del NPY/AgRP) o a los

péptidos “transcrito regulado por cocaína y anfetamina” (CART) y proopiomelanocortina (POMC), (neuronas del POMC/CART); (Hahn, Breininger, Baskin, & Schwartz, 1998).

Las neuronas del NPY/AgRP son reguladas positivamente por la grelina y negativamente por la leptina (Barsh & Schwartz, 2002; Sainsbury & Zhang, 2012). Consistente con su papel orexigénico, una inyección intraperitoneal de la grelina o la administración central de NPY, promueven un aumento en el consumo de alimento y la ganancia del peso corporal en animales con alimento *ad libitum* (Cabral, Fernandez, & Perello, 2013; Gehlert, 1999). Por otro lado, las neuronas del POMC/CART, proyectan hacia otros núcleos hipotalámicos implicados en la regulación de la ingesta donde liberan a  $\alpha$ -MSH, un producto del procesamiento de la proopiomelanocortina, en respuesta a concentraciones elevadas de la leptina.

En el déficit energético, cuando la concentración de la grelina aumenta y la de la leptina disminuye, la grelina llega al cerebro a través de transportadores presentes en la eminencia media desde donde eventualmente alcanza a sus células blanco, las neuronas del NPY/AgRP del arcuato, mientras que, la caída de la leptina, provoca una inhibición de la síntesis y liberación del POMC y el CART en el arcuato, dando como resultado final el aumento en la búsqueda y consumo de alimento para mantener la homeostasis en el organismo (Figura 1).



**Figura 1.** En el núcleo Arcuato, las neuronas del NPY/AgRP son reguladas positivamente por la grelina y negativamente por la leptina; por el contrario, las neuronas del POMC ( $\alpha$ -MSH) /CART son reguladas negativamente por la grelina y positivamente por la leptina; ambas subpoblaciones inervan a las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV, donde los ligandos a  $\alpha$ -MSH y a AgRP interactúan con los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3R y MC4R). El MC4R es expresado principalmente por neuronas de la TRH hipofisiotrópicas, donde el  $\alpha$ -MSH funciona como agonista y el AgRP como antagonista, para integrar diversas señales nutricionales, hormonales y neuronales y así regular la ingesta de alimentos y el gasto de energía. Modificado de McGraw-Hill Education. Jesús A. Fernández-Tresguerras. *Fisiología humana*, 4e. 2010.

### 1.5.2 Neuronas de segundo orden en el NPV

La interacción de las neuronas del NPY/AgRP, y de POMC/CART del arcuato con neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV está bien documentada. La innervación de terminales nerviosas de neuronas que sintetizan al NPY, comprende una de las innervaciones más conspicuas hacia las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas. Una de las dos fuentes principales de innervación de NPY hacia el NPV se origina en el núcleo arcuato; la otra en el tallo cerebral. Todas las divisiones del NPV reciben un aporte robusto de fibras nerviosas que contienen al NPY; las fibras nerviosas del NPY ingresan a la división magnocelular con una densidad baja de fibras mientras que, la acumulación más densa, coincide con el grupo de neuronas de la TRH hipofisiotrópicas en la parte dorsal de las subdivisiones medial parvocelular y periventricular. Las terminales nerviosas que contienen al NPY, innervan densamente los cuerpos y las dendritas de las neuronas de la TRH, estableciendo especializaciones predominantemente simétricas, aunque también se observan contactos asimétricos (Legradi & Lechan, 1998).

Por otro lado, los cuerpos celulares que contienen al AgRP, se encuentran casi exclusivamente en el núcleo arcuato, pero sus proyecciones se distribuyen ampliamente en el hipotálamo. Dentro del NPV, la innervación del AgRP se encuentra a lo largo del núcleo; la división magnocelular contiene densidades medias mientras que, las subdivisiones parvocelulares medial y periventricular contienen terminales nerviosas con alta densidad. La innervación del AgRP que reciben las neuronas de la TRH en el NPV es densa, con la aparición frecuente de sinapsis axosomáticas y axodendríticas, principalmente de tipo simétrico (Legradi & Lechan, 1999).

El neuropéptido Y y el AgRP coexisten en el núcleo arcuato, y ambos ejercen efectos orexigénicos. Se sabe que hay un alto grado de co-expresión del AgRP y del NPY en células del núcleo arcuato tanto en el ratón (hibridación *in situ*) como en la rata (inmunohistoquímica). Se estima que un 94.9 % de las células positivas para el ARNm del NPY expresan al ARNm del AgRP, y 98.4 % de las células

positivas para el ARNm del AgRP expresan el ARNm del NPY, por lo que la presencia del AgRP puede ser un marcador selectivo para terminales del NPY derivadas del núcleo arcuato (Broberger, Johansen, Johansson, Schalling, & Hokfelt, 1998).

### ***1.6 Actividad del eje adrenal durante el ayuno***

La corticosterona es una hormona de naturaleza esteroidea que se sintetiza y se libera de la glándula adrenal con múltiples blancos tanto a nivel central como periférico. El aumento de la corticosterona en sangre constituye un marcador general de la respuesta al estrés ya que su liberación depende del aumento en la síntesis y la secreción de la hormona liberadora de la corticotropina (CRH) del NPV del hipotálamo, y de la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) de la pituitaria anterior.

Durante el ayuno, la caída de la concentración de la leptina en la sangre y el aumento de la concentración de la grelina en la sangre, ocurren a la par con el aumento de la concentración de la corticosterona en la sangre, la cual promueve la utilización de aminoácidos como fuente de glucosa (Tischler, Henriksen, & Cook, 1988). Por ello, el análisis de éstos tres marcadores en la sangre, constituyen un medio de evaluación eficaz para determinar el grado de respuesta al ayuno en la población experimental.

### ***1.7 GABA***

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) es el neurotransmisor inhibitor por excelencia en el cerebro adulto, tanto de vertebrados como de invertebrados. En el sistema nervioso central (SNC) de vertebrados, aproximadamente el 30% de todas las sinapsis expresan a GABA (R., (2002). )



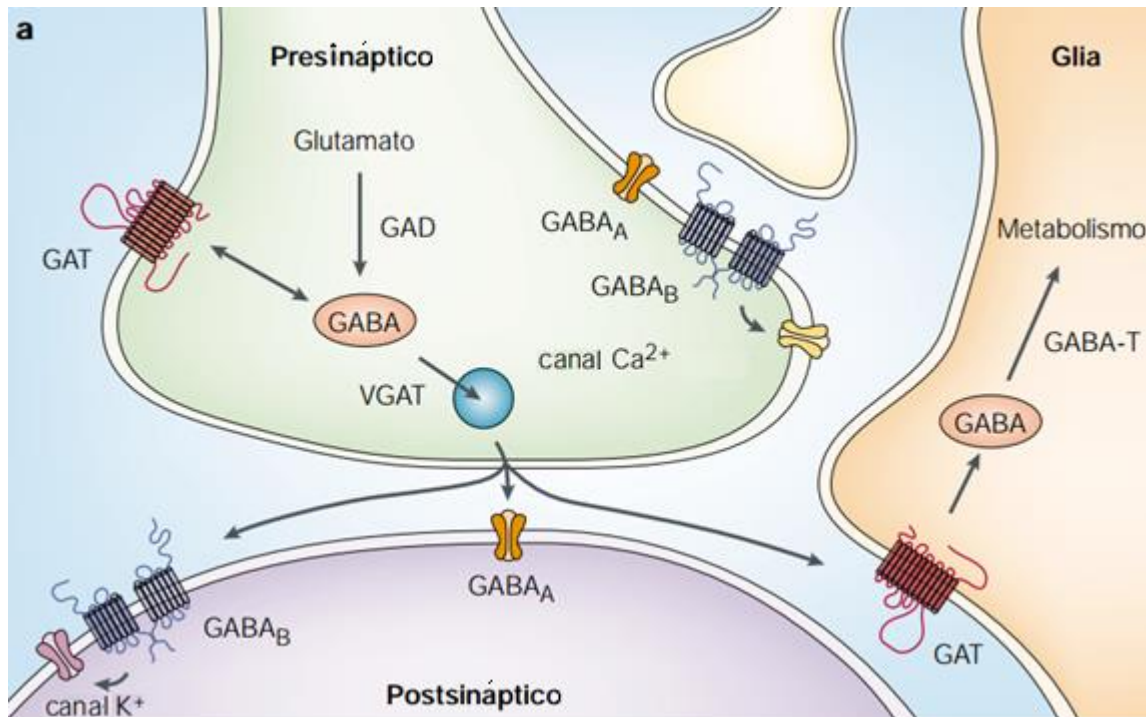
La síntesis de GABA se lleva a cabo casi exclusivamente a partir del glutamato, aunque también pueden servir de precursores el piruvato y la glutamina (Dale Purves, 2008; R., (2002)). El paso limitante en la biosíntesis de GABA es la descarboxilación del ácido L-glutámico, catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD, por sus siglas en inglés), la cual convierte el glutamato en GABA (Martin & Rimvall, 1993; R., (2002).)

Se han identificado dos isoformas de la GAD, la GAD65 y la GAD67 (Esclapez, Tillakaratne, Kaufman, Tobin, & Houser, 1994). Estas isoformas son codificadas por dos genes distintos y se transcriben únicamente en células positivas a GABA por lo que, la expresión de la GAD se emplea como marcador de las neuronas GABAérgicas. Algunas de las neuronas GABAérgicas expresan sólo una de las isoformas, mientras que otras expresan una mezcla de la GAD65 y la GAD67 (Esclapez, Tillakaratne, Tobin, & Houser, 1993). Cada isoforma difiere en su afinidad por el cofactor fosfato de piridoxal (necesario para la síntesis de GABA), así como en su localización subcelular. La GAD65 se encuentra mayormente como apoenzima, es decir, disociada a su cofactor, mientras que la GAD67 se encuentra asociada al fosfato de piridoxal, por lo que se considera la forma activa de la enzima (Martin & Rimvall, 1993). Si bien ambas isoformas se localizan en los cuerpos neuronales, en las dendritas y en los axones, la GAD65 se observa mayormente en las terminales nerviosas mientras que la GAD67 en los cuerpos neuronales y en las dendritas (Esclapez y cols., 1994; Kaufman, Houser, & Tobin, 1991).

En cuanto al control transcripcional de la GAD67, se ha reportado que la región promotora del gen que codifica para ésta enzima, presenta sitios de unión para los factores de transcripción, entre los que se encuentran el AP1, el AP2, Hox, E-box, egr-1, NF-kB y CREB (Bowers, Cullinan, & Herman, 1998; Szabo, Katarova, Kortvely, Greenspan, & Urban, 1996), de manera que la activación de estos factores de transcripción, inducirá cambios a la alza o a la baja en el contenido del ARNm que codifica para la GAD67 (Bowers y cols., 1998; Hanno-Iijima, Tanaka, & Iijima, 2015; Szabo y cols., 1996). La actividad neuronal promueve la expresión de Factor Neurotrópico derivado del cerebro (BDNF, por sus siglas en inglés: *Brain Derived*

*Neurotrophic Factor*) y de la GAD, ambos se regulan a la alza por acción del BDNF, por lo que BDNF puede emplearse como marcador de actividad de neuronas GABAérgicas (Matsumoto y cols., 2006).

En la figura 2 se resumen los componentes que forman parte de la biosíntesis y degradación del GABA.



**Figura 2.** Componentes de la síntesis y el transporte de GABA en las sinapsis. El GABA es sintetizado a partir del glutamato por la acción de la GAD, y es ingresado al interior de las vesículas por el transportador vesicular VGAT. Los receptores de GABA están localizados en la pre- y en la post-sinapsis. La recaptura de GABA ocurre a través de la acción del transportador membranal de GABA (GAT). Finalmente, el GABA es metabolizado por una reacción de transaminación, que es catalizada por la enzima GABA transaminasa (GABA-T). El metabolismo de GABA ocurre tanto en neuronas como en células de glía. Modificado de Owens, 2002 (Owens & Kriegstein, 2002).

## **1.8 GLUTAMATO**

El glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC de los mamíferos; casi todas las neuronas excitatorias del sistema nervioso central son de naturaleza glutamatérgica y se estima que más del 50% de todas las sinapsis del encéfalo liberan glutamato (Dale Purves, 2008).

La barrera hematoencefálica posee una permeabilidad muy baja al glutamato, por ello, todo el glutamato en el cerebro se sintetiza mediante la transaminación del  $\alpha$ -cetoglutarato, tanto en las neuronas como en la glía. En las células gliales, el glutamato es transformado a glutamina, que constituye el principal precursor del glutamato. La glutamina ingresa a las neuronas y, en la terminal sináptica, es convertida a glutamato por la acción de la glutaminasa. El glutamato es ingresado a las vesículas sinápticas por la acción de los transportadores vesiculares de glutamato (VGluT's) (Dale Purves, 2008). Hasta el momento se han identificado tres isoformas de VGluT's en el SNC: el VGluT1, el VGluT2 y el VGluT3. El VGluT1 y el VGluT2 se expresan únicamente en neuronas glutamatérgicas (Takamori, Rhee, Rosenmund, & Jahn, 2000, 2001), por ello se han considerado biomarcadores moleculares de estas neuronas, mientras que el VGluT3 ha sido encontrado en neuronas que utilizan otros neurotransmisores además de glutamato. Entre ellas podemos mencionar a las neuronas GABAérgicas, a las interneuronas colinérgicas, a las neuronas monoaminérgicas y a las células gliales (Fremeau y cols., 2002; Gras y cols., 2002; Schafer, Varoqui, Defamie, Weihe, & Erickson, 2002).

Además de los receptores, los transportadores membranales de glutamato o transportadores vesiculares (VGluT1-3) juegan un papel clave en la regulación de las concentraciones de glutamato extracelular (Hinoi, Takarada, Tsuchihashi, & Yoneda, 2005). Los VGluT's son necesarios para el transporte del glutamato al interior de las vesículas de secreción y, por lo tanto, pueden considerarse indicadores indirectos de la actividad glutamatérgica (Erickson, De Gois, Varoqui, Schafer, & Weihe, 2006).

En algunas enfermedades asociadas con alteraciones en la transmisión glutamatérgica, se ha determinado que cuando la alteración involucra incrementos en la transmisión glutamatérgica éstos van acompañados de un aumento en el contenido del ARNm del VGluT2, mientras que se presenta una disminución en su concentración cuando la alteración involucra una disminución de la actividad glutamatérgica (Scott, Alfredson, & Forsgren, 2008; Uezato, Meador-Woodruff, & McCullumsmith, 2009). Estos antecedentes ponen de manifiesto que el ARNm del VGluT2 es sensible a cambios en la transmisión glutamatérgica.

## **2. JUSTIFICACIÓN**

---

Los mecanismos moleculares que regulan el gasto o la conservación de la energía son complejos y no se conocen del todo. El balance energético se lleva a cabo por una red de señales neuronales y bioquímicas, que dan lugar a diferentes respuestas, como la ingesta de alimentos, la movilización de la energía, o la inapetencia, por mencionar algunos.

Las neuronas TRHérgicas del núcleo paraventricular, integran señales de la periferia y de otros núcleos del hipotálamo y el cerebro para mantener la homeostasis energética por lo que, caracterizar la respuesta de las mismas ante una condición de balance energético negativo como es el ayuno prolongado, permitirá ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares que mantienen el balance de energía, además de un mayor entendimiento de las patologías relacionadas con el consumo de alimentos, que conllevan al individuo a una condición de obesidad o en el caso opuesto, a la desnutrición.

## **3. HIPÓTESIS**

---

1. Las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV regulan a la baja la concentración del ARNm de la TRH durante el ayuno prolongado en ratones.
2. La actividad de las neuronas GABAérgicas aumenta, mientras que la actividad de las neuronas glutamatérgicas disminuye, en respuesta a un ayuno prolongado en el NPV, afectando la actividad de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas.

## 4. OBJETIVOS

---

### Generales

1. Evaluar la concentración del ARN mensajero de la TRH hipofisiotrópica en el NPV de ratones con un ayuno prolongado.
2. Evaluar la concentración del ARNm que codifica para el transportador 2 de glutamato (VGluT2) o el del ARNm que codifica para la enzima GAD67 en el NPV de ratones con inhibición significativa de la concentración del ARNm de la TRH, debido a un ayuno prolongado.

### Particulares

1. Evaluar la concentración del ARNm de la TRH por hibridación *in situ*, en neuronas de la zona hipofisiotrópica del NPV de ratones adultos de la cepa C57/BL6/JN, expuestos a 36, 44 o 50 h de ayuno prolongado.
2. Evaluar la concentración del ARNm del transportador vesicular de glutamato tipo 2 (VGluT2) por hibridación *in situ*, en el NPV de ratones adultos de la cepa C57/BL6/JN, con inhibición significativa de la concentración del ARNm de la TRH, debido a un ayuno prolongado.
3. Evaluar la concentración del ARNm de la enzima GAD67 por hibridación *in situ*, en el NPV de ratones adultos de la cepa C57/BL6/JN, con inhibición significativa de la concentración del ARNm de la TRH, debido a un ayuno prolongado.

## 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

---

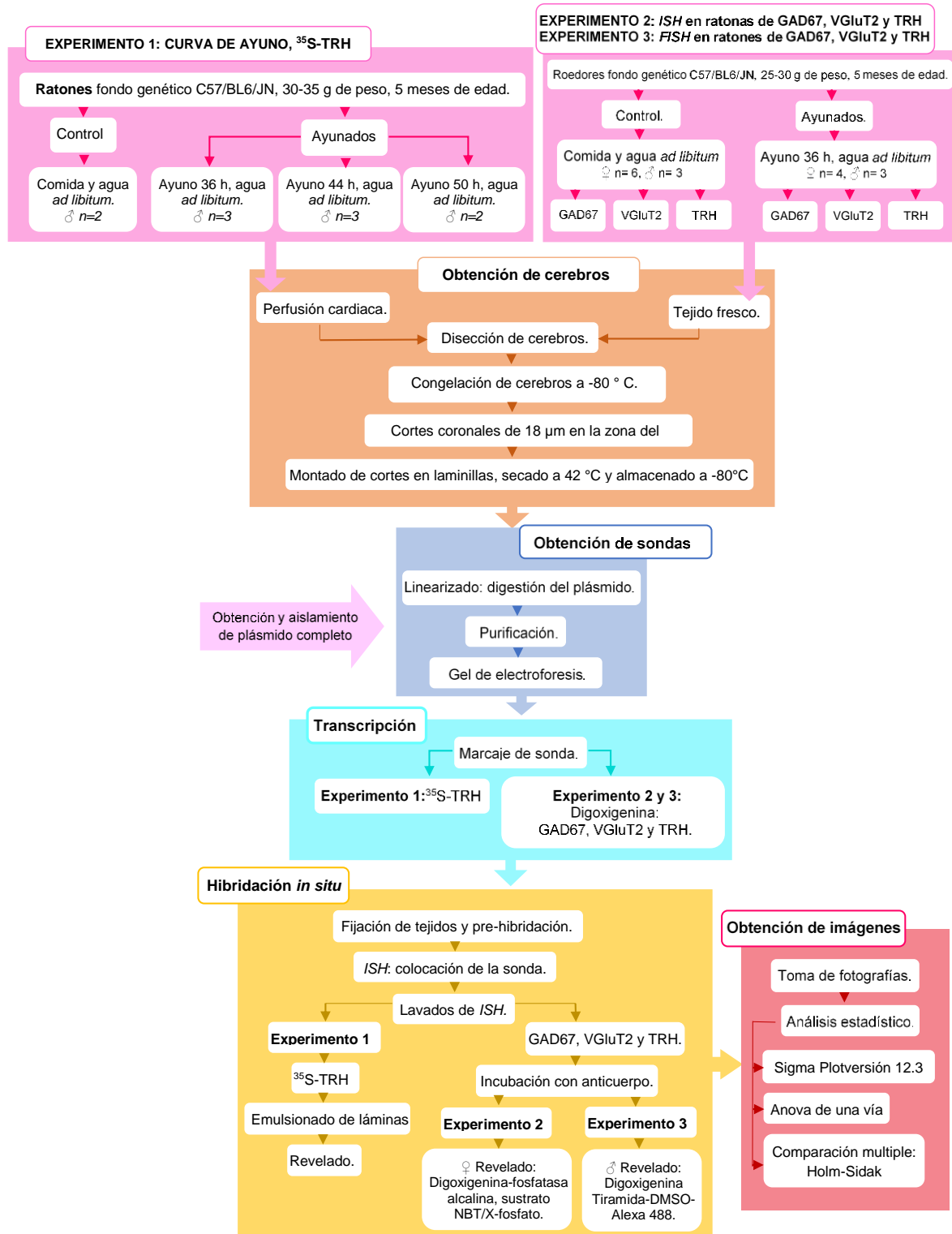
Para determinar el momento en el tiempo en el que ocurre la máxima inhibición de la concentración del ARNm de la TRH en respuesta a un ayuno prolongado, se evaluó la concentración del ARNm de la TRH por *hibridación in situ (ISH)* en neuronas de la zona medial hipofisiotrófica del NPV, de ratones adultos de la cepa C57/BL6/JN, expuestos a 36, 44 o 50 h de ayuno con sus respectivos controles.

La sonda marcada para identificar al ARNm que codifica para la proteína precursora de la pro-TRH, provino de un plásmido que contenía la secuencia del ADN complementario al ARNm de la pro-TRH. El plásmido linearizado y purificado, se empleó como templado para amplificar mediante transcripción *in vitro* y  $^{35}\text{S}$   $\alpha$ -UTP, la secuencia complementaria al ARNm de la pro-TRH (ARNc). Una vez marcado, el ARNc se usó para identificar neuronas de la TRH en cortes coronales de 18  $\mu\text{m}$  de grosor de cerebro de ratón, que comprendieron toda la zona medial del NPV en dirección antero-posterior. Las células positivas al ARNm de la TRH se cuantificaron como el número total de células o bien en dos categorías (señal alta y señal intermedia a baja) a lo largo de la zona medial hipofisiotrófica empleando el programa Image J. Los resultados fueron graficados y analizados estadísticamente.

Con base en los resultados obtenidos, se sometió a un nuevo grupo de ratonas y ratones a un ayuno de 36 h, con su respectivo control con alimento y agua *ad libitum*. En todos los grupos, se identificó y midió por *ISH*, la concentración del ARNm que codifica para el transportador de glutamato, el VGluT2 o la concentración del ARNm que codifica para la enzima que sintetiza al GABA, la GAD67 o el ARNm de la TRH en cortes de cerebro contiguos. La detección de los ARN mensajeros para el VGluT2, la GAD67 o la TRH en los cerebros de ratones macho, se realizó empleando sondas marcadas con digoxigenina  $\alpha$ -UTP y la unión de un anti-digoxigenina revelado con el fluorocromo Alexa 488; la detección de los transcritos en los cortes de cerebro de las ratonas, se realizó empleando sondas marcadas con digoxigenina  $\alpha$ -UTP y la unión de un anticuerpo anti-digoxigenina-

fosfatasa alcalina (Ab dig-PA), revelado con el sustrato para la PA NBT/X-fosfato. Las células positivas al VGluT2, la GAD67 o la TRH, fueron observadas con un microscopio de fluorescencia (Alexa 488) o un microscopio con campo claro (PA NBT/X-fosfato), adquiridas con una cámara digital acoplada al microscopio y presentadas como imágenes compuestas empleando Photoshop.





**Figura 3.** Diseño experimental utilizado para la identificación y el análisis de los ARNs mensajeros que codifican para la TRH, la GAD67 y el VGluT2, en el NPV de ratones adultos sometidos a un ayuno prolongado. Con base en los resultados

*obtenidos de una curva de ayuno entre 36-50 h (experimento 1), se sometió a un nuevo grupo de hembras y machos a un ayuno de 36 h (experimentos 2 y 3) para determinar: 1) la concentración del ARNm que codifica para el transportador de glutamato, el VGluT2, 2) la concentración del ARNm que codifica para la enzima que sintetiza al GABA, la GAD67 o 3) la concentración para el ARNm de la TRH por ISH, en cortes de cerebro contiguos.*

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Animales

Se utilizaron ratones machos y hembras adultos de fondo genético C57/BL6/JN, que fueron alojados en el bioterio del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, en condiciones de temperatura controlada (22-24°C), agua y alimento *ad libitum*, bajo un ciclo de luz-oscuridad (12/12 h; la fase de oscuridad inició a las 19:00 h), previamente aprobados por el Comité de Ética del IBT e INPRFM (Proyectos Conacyt 107109, INPRFM NC19110.0).

**Tabla 1**

*Número de animales en los diferentes grupos experimentales empleados para las hibridaciones in situ.*

EXPERIMENTO 1 Cerebros perfundidos		EXPERIMENTO 2 Cerebros congelados		EXPERIMENTO 3 Cerebros congelados	
Grupos	n	Grupos	n	Grupos	n
♂ Ayuno 36 h	3	♀ Ayuno 36 h	4	♂ Ayuno 36 h	3
♂ Ayuno 44 h	3	♀ Control	6	♂ Control	3
♂ Ayuno 50 h	2				
♂ Control	2				

### 6.2 Material y agua libre de ARNsas

Los procedimientos que se describen a continuación, fueron realizados en condiciones libres de ARNsas, usando guantes en todo momento e inhibidor de ARNsas (ARNse Zap, Ambion N° cat AM9782M). Para lograr estas condiciones todo el instrumental y material utilizado en los procedimientos, se horneó a 180 °C durante 12 h o se sometió a 120 lb de presión en una autoclave durante 30 min o se limpió perfectamente con inhibidor de ARNsas, dependiendo de la naturaleza del material (vidrio, plástico o metal). El agua (H<sub>2</sub>O desionizada mili Q, calidad: 18M Ω/ cm) que se utilizó para la preparación de las soluciones se colectó en botellas

de vidrio previamente horneadas a 180°C durante 12 h y siguió un paso de esterilización de 30 min en una autoclave a 120 lb de presión (H<sub>2</sub>O *ISH*).

### **6.3 Obtención de tejidos perfundidos**

Para obtener los cerebros perfundidos, se administraron 100 U de Pentobarbital sódico (63 mg/mL, Pet's pharma) a todos los roedores i.p.; una vez anestesiados, se les realizó una perfusión transcárdica con 15 000 UI/L de heparina (Inhepar, solución inyectable 5,000 U/mL) disuelta en 20 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) 1X pH 7.4 [PBS 10X= 1.36 M NaCl, 14.7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26.8 mM KCl, H<sub>2</sub>O-*ISH*], seguido de 5 mL de paraformaldehído al 4% (Sigma Cat No P6148-1kg) disuelto en PBS 1X pH 7.4, para fijar el tejido. Una vez finalizada la perfusión, se disecó el cerebro, preservándolo en 10 mL de paraformaldehído al 4% en PBS 1X, pH 7.4. Dos horas después de su almacenamiento se substituyó este último con 10 mL de sacarosa al 25% (J.T. Baker CAT N° 4072-01) en PBS 1X pH 7.4 para criopreservar el tejido; se almacenó por 12 h a 4°C o bien hasta que la muestra se encontrara en el fondo del frasco; posteriormente se removió la sacarosa para congelar el cerebro en hielo seco pulverizado y se almacenó a -80 °C en un ultracongelador (marca Thermo Scientific modelo 956) hasta su uso.

### **6.4 Obtención de tejidos congelados**

Los ratones que no fueron sometidos a perfusión cardíaca, recibieron una dosis de 100 U de Pentobarbital sódico (63 mg/mL, Pet's Pharma) i.p.; una vez anestesiados, se decapitaron y se les extrajo el cerebro, el cual se congeló inmediatamente en hielo seco pulverizado y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

### **6.5 Preparación de tejidos para hibridación**

Se realizaron cortes coronales de 18  $\mu\text{m}$  de grosor por medio de un criostato (marca Microm, modelo HM525) a una temperatura de  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$  para los cerebros congelados y de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para los cerebros perfundidos a lo largo del núcleo paraventricular hipotalámico en dirección anteroposterior (bregma:  $-0.46$  al  $-1.06\text{ mm}$  George Paxinos, The Mouse Brain segunda edición). **Los tejidos perfundidos** fueron colectados en PBS 1x,  $\text{pH}=7.4$ ; se montaron 6 cortes seriados por laminilla en portaobjetos cargados electrostáticamente (marca Fisher Scientific, Cat. 125-550-15, Superfrost 25 x 75 x 1 mm) con la ayuda de un pincel fino previamente tratado con inhibidor de ARNsas y PBS 1x. Posteriormente se colocaron en una estufa con temperatura controlada (marca Hinotek, Modelo DZF-6030A) a  $42^{\circ}\text{C}$ , toda la noche para optimizar la adherencia del tejido a la laminilla. Finalmente, se almacenaron en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. **Los tejidos congelados** se adhirieron directamente a la laminilla, con calor local del guante a la zona de adherencia, y siguiendo la misma secuencia de cortes seriados utilizada para los cortes perfundidos; los cortes congelados también se almacenaron en un ultracongelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **6.6 Linearización y purificación de los plásmidos que contienen la secuencia complementaria para el ARNm de la TRH, el VGluT2 y la GAD67**

Para identificar el ARNm de interés en el cerebro del ratón, se utilizaron plásmidos con la secuencia del gen de interés, caracterizados y reportados previamente en la literatura (la TRH: Kádár y cols., 2010; el VGluT2: Hrabovsky y cols., 2004; la GAD67: Curran-Rauhut MA y cols., 2002). Se utilizó un plásmido que contiene 741 pares de bases (pb) del ADNc complementario a las bases 106–846 del ARNm de la TRH (número de registro en el Gene Bank: BC053493; secuencia en la sección de anexos), un plásmido que contiene 879 pb de la secuencia del ADNc complementario a las bases 522-1400 del ARNm del VGluT2 (número de registro en el Gene Bank NM\_053427; secuencia en la sección de anexos), y un plásmido

que contiene un fragmento de 535 pb del ADNc complementario a las bases 232-769 del ARNm de la GAD67 (número de registro en el Gene Bank: NM\_017007.1; secuencia en la sección de anexos).

Los plásmidos completos se sometieron a una digestión con enzimas de restricción utilizando la siguiente regla de digestión: 1 Unidad de enzima digiere 1 µg de plásmido de referencia, incubando a una temperatura de 37°C por 1 hora, en una reacción total de 50 µL (tabla 2).

**Tabla 2**

*Enzimas de restricción y soluciones amortiguadoras empleadas para la digestión de plásmidos.*

<b>Plásmido completo</b>	<b>Enzima de restricción</b>	Concentración comercial de la enzima	Amortiguador para la enzima
<b>VGluT2</b>	<b>Sal I</b> (New England Biolabs, Cat. R0138S)	20 U/µL	NE 3.1 10X
<b>TRH</b>	<b>NcoI</b> (New England Biolabs, Cat. R0193S)	10 U/µL	NE 3.1 10X
<b>GAD67</b>	<b>Sac I</b> (New England Biolabs, Cat. R0156L)	20 U/µL	NE 2.1 10X

Cada reacción de linearización se llevó a cabo en un tubo *Eppendorf®*; se tomó una alícuota de los plásmidos completos y se agregaron los reactivos en el orden que presenta la tabla 3.

**Tabla 3**

*Linearización de los plásmidos utilizados para la ISH del VGluT2, la GAD67 y la TRH.*

		<b>TRH</b>	<b>VGluT2</b>	<b>GAD67</b>
Amortiguador		10 µL	10 µL	10 µL
Plásmido		30 µg	30 µg	30 µg
Agitación mecánica				
Enzima de restricción		30 U	30 U	30 U
		NcoI	Sal I	Sac I
H <sub>2</sub> O libre de ARNasas		Aforar a 100 µL	Aforar a 100 µL	Aforar a 100 µL
Mezclado manual				
Volumen total		100 µL	100 µL	100 µL

Las mezclas se incubaron de 4-6 h a 37° C en un horno seco con temperatura controlada (marca Hinotek, Modelo DZF-6030A). Una vez transcurrido el tiempo de linearización, se transfirieron a hielo frappé con el fin de detener la reacción.

### **6.7 Purificación del ADN de los plásmidos linearizados**

La purificación del ADN se llevó a cabo mediante una extracción con 1 volumen de una mezcla de fenol (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>O):cloroformo (CCl<sub>3</sub>) 1:1 (v/v); el cloroformo se encontraba en una mezcla cloroformo (CCl<sub>3</sub>): alcohol isoamílico [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH] 24:1 (V/V); para este paso se adicionó primero el fenol y se agitó mecánicamente con un vórtex durante 1 min, o bien hasta que la mezcla se volviese de apariencia lechosa; a continuación se adicionó la mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, agitando nuevamente con un vórtex durante 1 min; se centrifugó a T.A por 4 min a 19400 g. Posteriormente se adicionó 1 volumen de H<sub>2</sub>O Mili Q libre de ARNasas en el tubo *Eppendorf* que contenía la fase orgánica, se agitó con un vórtex durante 1 minuto, se centrifugó a T.A por 4 min a 19400 g y se juntó con la fase acuosa de la primera extracción. A este tubo se le realizó una

segunda extracción con 1 volumen de cloroformo ( $\text{CCl}_3$ ): alcohol isoamílico  $[(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}]$  24:1 (V/V) y se agitó con un vórtex durante 1 min; se centrifugó a T.A por 4 min a 19400 g. En este paso se desechó el tubo que contenía la fase orgánica. Nuevamente se recuperó el sobrenadante (fase acuosa) en un tubo estéril de 1.5 mL y se midió el volumen final obtenido, el cual se precipitó con 1/10 de NaCl 5 M y 3 volúmenes de EtOH absoluto; se mezcló perfectamente y se dejó precipitar toda la noche (O/N) a  $-80^\circ \text{C}$  (aproximadamente 12 h). Posteriormente se recuperó la pastilla que contenía el plásmido linearizado por centrifugación a 19400 g durante 30 min a  $4^\circ \text{C}$ . El sobrenadante de etanol obtenido se decantó cuidando que la pastilla quedara adherida al tubo *Eppendorf* y ésta se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de EtOH frío al 70% ( $4^\circ\text{C}$ ), se mezcló para después centrifugar por 10 min a  $4^\circ\text{C}$  a 19400 g, para retirar el exceso de NaCl. Nuevamente se retiró la mayor cantidad posible del sobrenadante (alcohol al 70%) y se dejó secar la pastilla a T.A de 10 a 20 min; la pastilla seca se resuspendió en un volumen de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de ARNasas, estéril en un volumen que permitiera obtener una concentración final aproximada de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de ADN lineal.

Por último, se corrió un gel de electroforesis, empleando 0.5  $\mu\text{g}$  del ADN para verificar que la linearización de los plásmidos fuese completa y también, para confirmar la calidad y la concentración del ADN purificado. Una vez verificada la concentración y calidad del ADN en el gel, se procedió a almacenar la muestra a  $-20^\circ \text{C}$  hasta su uso.

### **6.8 Gel de electroforesis**

Para verificar si la linearización había sido total, se preparó un gel de agarosa al 1% (Standard Low, Bio-Rad laboratories Cat. N° 162-0102) en un volumen de 50 mL de TBE 1X (Tris borato y EDTA, ver apéndice); se cargaron 0.5  $\mu\text{g}$  o bien 1/10 del volumen de la reacción/pozo, para cada uno de los plásmidos digeridos, más 2  $\mu\text{L}$  de colorante y 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili Q, a la par con 4  $\mu\text{L}$  de Marcador IV como ADN de referencia (Ladder Roche, cat. N°1 418009). El gel se corrió con un voltaje de



100-120 Volts, durante 1:00 - 1:30 h. Se tiñeron las bandas usando bromuro de etidio (300  $\mu$ L del Stock [10 mg/mL] / 250 mL agua; Sigma Aldrich, cat. N° SAE87511) por 5 min, en condiciones de poca luz; se retiró el gel del contenedor que contenía bromuro de etidio y después de lavarlo 2 veces por 10 min cada vez en H<sub>2</sub>O, se introdujo en el analizador de geles System gel Doc Ez® (Cat. 1708270, Biorad). Una vez confirmada la linearización total del plásmido, se procedió al paso de purificación descrito en el apartado anterior.

### ***6.9 Análisis de los ARNm de la TRH, el VGlut2 y la GAD67 en el NPV por hibridación in situ***

#### **6.9.1 Transcripción in vitro. Marcaje de sondas de ARN complementarias al ARNm de la TRH, el VGlut2 y la GAD67**

Se utilizaron sondas marcadas con digoxigenina-11- $\alpha$ -UTP (dig-UTP) y <sup>35</sup>S- $\alpha$ -UTP (<sup>35</sup>S-UTP) para lo cual se realizó una transcripción con 1.5  $\mu$ g de plásmido del VGlut2, la GAD67 y la TRH, previamente linearizado y desnaturalizado por 5 min a 65°C y después colocado en hielo; se prepararon las reacciones en tubos *Eppendorf* para cada transcrito como se muestra a continuación: 2  $\mu$ L de amortiguador de transcripción 10x, 1  $\mu$ L de DL-Dithiothreitol (DTT) 0.1 M, 3  $\mu$ L de una mezcla de nucleótidos A, G, C 10 mM (NTP's; A,G,C 1:1:1), 2  $\mu$ L de rUTP frío 1 mM, 2  $\mu$ L de digoxigenina 11-UTP 10 mM (Cat. N° 3359247910, Roche), 20 U de inhibidor de ARNasas (RNase out, 40 U/ $\mu$ L), 30 U de la ARN polimerasa correspondiente (tabla 4), H<sub>2</sub>O *ISH* hasta completar 20  $\mu$ L del volumen final.

**Tabla 4**

*ARN polimerasas utilizadas para la transcripción in vitro de los ARNc para el VGluT2, la GAD67 o la TRH.*

<b>Plásmido linearizado</b>	<b>ARN polimerasa utilizada para generar la cadena antisentido</b>
VGluT2/ Sal I	T7 (5000 UI; 20 U/ $\mu$ L, Roche Cat. N° R2251S)
TRH/ Nco I	SP6 (1000 UI; 20 U/ $\mu$ L, Roche Cat. N° 10 810 274 001)
GAD67/ Sac I	T7 (5000 UI; 20 U/ $\mu$ L, Roche Cat. N° R2251S)

Los tubos con la mezcla de reacción se colocaron en un horno con temperatura controlada a 37° C durante 1 hora; posteriormente se adicionó 1  $\mu$ L de ARN polimerasa a cada tubo (de acuerdo a la tabla 4), equivalente a 30 U de enzima. Nuevamente se incubó a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este periodo se adicionaron 10 unidades de ADNsa I 10 U/ $\mu$ L (Roche, cat. N° 04 716 728 001), 0.5  $\mu$ L de inhibidor de ARNasas (40 U/ $\mu$ L) equivalente a 20 U, 1  $\mu$ L de ARN de transferencia 10  $\mu$ g/ $\mu$ L (tARN de Levadura tipo X-SA, Sigma-Aldrich, cat. N° R8759-500UN) y se incubó a 37°C por 45 min. Para detener la reacción de transcripción se adicionó H<sub>2</sub>O milli Q hasta llegar a un volumen final de 100  $\mu$ L. Los transcritos marcados se precipitaron con 1/25 de volumen de NaCl 5 M y 3 volúmenes de etanol absoluto frío durante 12 h a -20°C. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron por 30 min a 19400 g a 4°C y se retiró el sobrenadante para dejar secar la pastilla de ARN por 10 min a T.A. Posteriormente se resuspendió la sonda de ARN en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O -ISH/SDS 0.2%. Se realizó una 2ª precipitación con 1/25 volumen de NaCl 5 M (saturado) y 3 volúmenes de etanol absoluto frío durante toda la noche a -20°C. El transcrito se recuperó por centrifugación a 19400 g a 4°C durante 30 min; a continuación, se retiró el sobrenadante dejando sólo la pastilla que contenía la sonda marcada y se resuspendió y mezcló nuevamente en 500  $\mu$ L de EtOH al 70 %. Para finalizar, se centrifugó a 19400 g a 4°C durante 10 min, y se retiró el sobrenadante para dejar sólo la pastilla que contenía la sonda marcada. La pastilla

se resuspendió por última vez en 100 µL de SDS-H<sub>2</sub>O-ISH al 0.1% y el transcrito marcado se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **6.9.2 Pre-hibridación y fijación de tejidos perfundidos**

Los tejidos montados en laminillas para hibridación se colocaron dentro de vasos coplin y se agregó por tiempos y en orden las siguientes soluciones:

- 1 lavado en PBS 1X durante 3 min a T.A.
- 1 lavado con tritón X-100 (Sigma Aldrich, T8787) al 0.3%- PBS 1X en H<sub>2</sub>O-ISH durante 15 min a T.A.
- 1 lavado en PBS 1X durante 3 min a T.A.
- Incubación con proteasa K (1 µg/mL) con agitación continua durante 30 min a 37°C.
- Fijación adicional en paraformaldehído al 4% / 0.006 N NaOH / PBS 1X frío (4°C) durante 5 min a T.A.
- 2 lavados en PBS 1X durante 3 min a T.A.
- Acetilación con anhídrido acético (Sigma Aldrich, Cat. 320102) al 0.25% - trietanolamina (Sigma Aldrich, Cat.T58300) 0.1M durante 10 min a T.A. *\*esta solución se prepara al momento debido a que el anhídrido acético se ioniza con el agua; se utiliza trietanolamina (TEA) para mantenerlo en su forma original, sin embargo, ésta última pierde su propiedad protectora al oxidarse con la luz.*
- Incubación en formamida al 50% en SSC 2X H<sub>2</sub>O-ISH en un rango de 10 min a 1 hora, a 37°C. Las laminillas pueden permanecer en esta solución hasta que les sea colocada la mezcla de hibridación.

### **6.9.3 Pre-hibridación y fijación de tejidos congelados**

Los tejidos montados en laminillas para hibridación se colocaron dentro de vasos coplin y se agregó por tiempos y en orden las siguientes soluciones a T.A:

- Paraformaldehído al 4%/0.006 N NaOH/PBS 1X frío (4°C) durante 10 min a
- Anhídrido acético 0.895%/0.25 % Trietanolamina por 10 min.

- SSC 2X durante 2 min.
- EtOH 75% por 2 min.
- EtOH 80% 2 min.
- EtOH 95% 2 min.
- EtOH absoluto 2 min.
- Cloroformo (Sigma Aldrich, cat. N° V001674-1L) durante 5 min.
- EtOH absoluto por 2 min.
- EtOH 95% por 2 min.

Por último, las laminillas se dejaron secar tendidas sobre la mesa en una superficie libre de polvo antes de hibridar.

#### **6.9.4 Mezcla de hibridación**

Un mL de mezcla de hibridación contuvo las siguientes soluciones stock:

- 0.1 g de dextrán sulfato (Sigma-Aldrich, cat. N° D8906-50G).
- 100 µL de SSC 2X.
- 250 µL de Tris HCl 1M pH 8.0.
- 10 µL de Denhardt's 100 X.
- 10 µL de DL-Dithiothreitol 1M.
- 25 µL de ADN de esperma de salmón (Sigma-Aldrich, cat. N° D1626-250 mg) previamente desnaturalizado 5 min/65°C.
- 500 µL de formamida (Sigma-Aldrich, cat. N° F7503-1L).
- 20 µL de SDS al 10 %.

Se aforó a 1 mL con H<sub>2</sub>O *ISH* y se incubó a 54°C previo a la hibridación.

#### **6.9.5 Hibridación in situ radiactiva (<sup>35</sup>S) o fluorescente (FISH) para la TRH, el VGluT2 y la GAD67**

A cada laminilla se le agregó 0.75 µL de DTT 1 M, 3 µL de sonda marcada con digoxigenina (el VGluT2, la GAD67 o la TRH), o 0.5x10<sup>6</sup> cuentas por min (cpm) de sonda de la TRH marcada con <sup>35</sup>S-UTP y CBP de mezcla de hibridación para obtener un volumen final de 60 µL por cada lamina; una vez que el volumen

embebíó los cortes, se cubrió la superficie de la lámina que contenía los cortes con papel Parafilm® (2 x 2.5 cm o del tamaño necesario para cubrir los cortes), evitando la formación de burbujas. Las láminas se colocaron dentro de una cámara húmeda horizontal (ver apéndice) para incubarse a 54°C por aproximadamente 14-16 h.

#### **6.9.6 Lavados post-hibridación**

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se sacaron las laminillas del horno y una a una se fueron colocando en un vaso de precipitados que contenía 40 mL de SSC 1X a T.A para retirar el Parafilm® y la mezcla de hibridación dentro de la solución. Posteriormente se acomodaron las láminas en vasos coplin con SSC 1X durante 15 min a T.A y con agitación constante; transcurrido el tiempo, las soluciones se sustituyeron para realizar una serie de lavados con agitación continua y diferentes condiciones de astringencia y temperatura con el fin de eliminar el pegado inespecífico de la sonda:

- Amortiguador para la ARNsa A 1X (ver apéndice) por 5 min a 37°C.
- ARNsa A (50 µg/mL) disuelta en amortiguador para ARNsa A al 1X durante 1 hora a 37 °C.
- SSC 1X por 15 min a 65°C.
- SSC 0.5X por 15 min a 65°C.
- SSC 0.1X durante 30 min a 65°C (2 veces).
- SSC 0.1X de 3 a 5 min a T.A.

Las láminas pasaron directamente de la última solución de lavado a la solución de bloqueo para mantener la humedad constante.

#### **6.9.7 Solución de bloqueo e incubación con un anticuerpo antidigoxigenina-fosfatasa alcalina**

La última solución de lavado se sustituyó por la una mezcla de bloqueo, la cual se preparó con concentraciones finales de SSC 2X, Albumina bovina al 2% grado cultivo celular (BSA marca sigma Cat. A-8022), Tritón X-100 al 0.05% y H<sub>2</sub>O *ISH*.

Se homogenizó en un vórtex hasta su disolución; las láminas se incubaron durante 5 h con agitación moderada a 22°C.

Transcurrido este tiempo, se agregaron 60 µL de una mezcla de bloqueo con anticuerpo por cada lámina, la cual se preparó con concentraciones finales de anticuerpo anti dig-fosfatasa alcalina (Ab dig-PA) 1:50, Albúmina (BSA) al 1%, Tritón X-100 al 0.3% y amortiguador A como disolvente (0.1M Tris HCl pH=7.6, NaCl 0.15 M en H<sub>2</sub>O-*ISH*); la laminilla se cubrió a lo largo con un Parafilm de 2 x 2.5 cm, se evitó la formación de burbujas y se introdujeron las láminas horizontalmente en una cámara húmeda (preparada sólo con agua y papel absorbente colocado en la parte superior de la tapa), se incubaron de esta forma a 4°C, durante 48 h.

#### **6.9.8 Revelado de láminas**

Para hacer evidente la señal del ARNm hibridado con la sonda marcada con digoxigenina y unida a un anticuerpo Ab-dig-PA, se utilizó un sustrato colorido (NBT/X fosfato) o bien un sustrato fluorescente con amplificación (Tiramida-DMSO-Alexa 488). Para el revelado de la sonda marcada con el isótopo radiactivo, se emulsionaron las láminas con una película fotográfica NTB (Kodak), que al ser expuesta a las partículas radiactivas mostraron un precipitado de partículas de plata sobre la región positiva al ARNm de interés. Los revelados se explican en los próximos párrafos y se realizaron de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla 5**

*Marcaje de sondas para el VGluT2, la GAD67 o la TRH con <sup>35</sup>S-UTP o dig-UTP y su conjugado a revelar (PA o FISH), en los diferentes grupos experimentales de ayuno y control.*

	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>	<b>Experimento 3</b>
<b>Sonda</b>	<b>Marcaje y su conjugado</b>		
<b>VGluT2</b>	-	Digoxigenina-fosfatasa alcalina (PA).	Digoxigenina/Tiramida-DMSO-Alexa 488 ( <i>FISH</i> ).
<b>GAD67</b>	-	Digoxigenina-fosfatasa alcalina (PA).	Digoxigenina/Tiramida-DMSO-Alexa 488 ( <i>FISH</i> ).
<b>TRH</b>	<sup>35</sup> S-UTP	Digoxigenina-fosfatasa alcalina (PA).	Digoxigenina/Tiramida-DMSO-Alexa 488 ( <i>FISH</i> ).

#### **6.9.9 Revelado de láminas con anti digoxigenina-fosfatasa alcalina (Ab dig-PA)**

Para revelar la señal de las sondas marcadas con digoxigenina, se utilizó un anticuerpo anti digoxigenina-fosfatasa alcalina (Ab dig-PA) y el sustrato para la PA NBT/X-fosfato (NBT, Cat. 11383213001, Roche; X-fosfato, Cat. 11383221001, Roche).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con el Ab dig-PA, se sacaron las láminas del refrigerador y se les retiró el Parafilm® dentro de una solución de amortiguador A (0.1 M Tris HCl pH 7.6 y 0.5 M NaCl disueltos en H<sub>2</sub>O). Una vez libres de Parafilm®, a las láminas se cambiaron a una solución que contenía NBT/X-fosfato; se paró la reacción al cambiar esta última solución por otra que contenía Amortiguador B. Las láminas se enjuagaron dos veces en el amortiguador B y 1 vez en agua; por último, se dejaron secar y se recubrieron con medio de montaje y cubre objetos de 22 x 50 mm (Cat. E72236-60, Fisher). Después de unos días se

observaron al microscopio y se adquirieron imágenes con un microscopio de campo claro DM 1000 LED y una cámara DFC450C Leica.

#### **6.9.10 Revelado de señal con Digoxigenina, Tiramida-DMSO-Alexa 488**

Transcurrido el tiempo de incubación con un anticuerpo (Ab) dig-peroxidasa (Ab-dig-POD), se reveló la señal de hibridación con fluorescencia TSA (señal de amplificación de Tiramida).

Se atemperaron las laminillas y soluciones a usar durante 30 min. Posteriormente se retiró el parafilm de las laminillas dentro de una solución de PBT (PB 0.01 M pH 7.4 / NaCl al 0.9%/ Tween 20 al 0.1%) para después ser lavadas 3 veces en la misma solución a T.A y en agitación constante durante 15 min. En condiciones de obscuridad parcial, se colocó sobre cada lamina, de manera individual, la mezcla de revelado (Tiramida al 0.01% / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.0015%), usando un amortiguador de amplificación como disolvente (estuche mp 20912, #2 Invitrogen) suficiente para cubrir la preparación, e inmediatamente se recubrieron las laminillas con un Parafilm®; se procuró que los cortes se embebieran por completo, libres de burbujas, durante 15 min a T.A. Se retiró nuevamente el parafilm dentro de la solución de PBT. Cuando la señal revisada en el microscopio fue óptima, se lavaron las láminas 3 veces en PBT por 15 min a T.A con agitación constante y un último lavado con PBT 0.01 M durante 15 min a T.A con agitación constante. Las laminillas se dejaron secar, se resguardaron de la luz y se observaron al microscopio. Después del análisis se almacenaron en un lugar protegido de la luz y con baja humedad.

#### **6.9.11 Emulsión de laminillas marcadas con <sup>35</sup>S-UTP**

- Las láminas que fueron hibridadas únicamente con la sonda radiactiva pasaron del último lavado post hibridación (SSC 0.1X a T.A) a deshidratación con concentraciones de etanol ascendentes como sigue:
- EtOH 75% por 2 min.



- EtOH 80% 2 min.
- EtOH 95% 2 min.
- EtOH absoluto 2 min.

Al término de la deshidratación, en condiciones de total oscuridad dentro un cuarto oscuro, las láminas se extendieron sobre la mesa de trabajo para permitir el secado total de las mismas. Enseguida se utilizó una emulsión (NTB, Kodak) diluida 1:1 (H<sub>2</sub>O destilada), la cual fue incubada durante 15 min dentro de un baño de agua con temperatura de 42 °C para llevarla a la fase líquida; transcurrido ese tiempo, se homogenizó el contenido del frasco de emulsión -lentamente con un agitador de vidrio y sin formar burbujas- y se vació en una copa de vidrio estrecha (Cat. #70520, Electron Microscopy Sciences) para humedecer únicamente el área de interés de las láminas. Las láminas se introdujeron una a una en la emulsión, en posición vertical durante 5 segundos, para después ser mantenidas en la misma posición, en una gradilla durante una hora para su secado; una vez secas se guardaron en una caja de plástico protegida de la luz, con capsulas de silica gel deshidratadas. La caja fue resguardada de la luz y se mantuvo a 4°C durante 7 días para el ARNm de la TRH.

#### **6.9.12 Revelado de las laminillas emulsionadas, marcadas con <sup>35</sup>S-UTP**

El revelado de las láminas se llevó a cabo en condiciones de total oscuridad dentro un cuarto oscuro; todas las soluciones que se utilizaron se encontraron en un rango de temperatura de 13 ± 1 °C. Las láminas se sumergieron en el siguiente orden:

- Revelador (*ISH D-19* Kodak) por 1.40 min.
- Ácido acético al 2% por 1 min.
- Fijador (GBX FCS) durante 4 min.
- Nuevamente en fijador por 4 min, con la luz roja de seguridad encendida
- H<sub>2</sub>O por 4 min.

Posterior al revelado, las láminas se sometieron a un tren de deshidratación a temperatura ambiente, sumergiéndolas en las soluciones en el siguiente orden:

- Alcohol al 70% por 2 min.
- Alcohol al 80% por 2 min.
- Alcohol al 90% por 2 min.
- Alcohol al 95% por 2 min.
- Alcohol absoluto durante 2 min.
- Nuevamente Alcohol absoluto por 2 min.
- Xilol durante 2 min.

Aún dentro de esta última sustancia, se tomó una lámina, una a la vez, y se agregaron 2 gotas de medio de montaje; se colocó un cubreobjetos encima de la preparación, evitando la formación de burbujas y se dejó secar por 24 h.

### **6.9.13 Adquisición y cuantificación de imágenes de los tejidos hibridados**

Al término de la *hibridación in situ*, se midió la concentración del ARN mensajero de la TRH. La imagen de cada corte de cerebro se tomó en la zona del NPV dividido para su estudio en anterior, medio, medio-posterior y posterior; de esta forma las señales se analizaron y compararon entre zonas y entre grupos experimentales, cuantitativa y cualitativamente. Las imágenes fueron adquiridas empleando el objetivo de 40X en las láminas hibridadas con <sup>35</sup>S-UTP, para lo cual que se utilizó un microscopio Optika 4083.B5 (Italia) con campo oscuro, conectado a una cámara y software OPTIKA TCB 5.0 (Italia). Para las láminas reveladas con Tiramida-DMSO-Alexa 488, se utilizó un microscopio para fluorescencia marca Leica DM 1000 LED con objetivos HI PLAN 10X/0.25, 20X/0.40 o 40X/0.65 y filtros con paso de banda (BP) de 480-40/ espejo dicromático (DM) 505/ barrera de paso (LP) 527/30. Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital Firewire (DFC450C, Leica) y un software Leica Application Suite®.

Para el análisis del experimento en la curva de respuesta del ARNm de la TRH al ayuno, hibridado con la sonda  $^{35}\text{S}$ -UTP, se cuantificó **el número total de células positivas a la TRH** o bien dos categorías, **1) células con señal alta**, en donde el experimentador no visualiza granos de plata individuales en una misma célula y **2) células con señal intermedia a baja**, en donde el experimentador visualiza granos de plata individuales en una misma célula.

El análisis se realizó delimitando la zona que comprende el NPV y dividiendo el núcleo de anteroposterior, con el programa Image J, versión 1.52 de uso libre (National Institutes of Health, USA). En este programa las fotografías se convirtieron a imágenes en escala de grises de 8 bits, se invirtió la luz para que las células se apreciaran en blanco y negro (negro=señal positiva) y se les ajustó el umbral a 245 que considera todos los tonos de grises para su medición. Los datos de cada categoría fueron exportados a Excel, para ser organizados y promediados por animal y grupo experimental. El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma Plot versión 12.3 para determinar diferencias entre grupos mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía (grupo control con alimento ad libitum contra los grupos de ayuno de 36, 44 o 50 h) y comparación múltiple con la prueba Holm-Sidak.

La señal fluorescente para las hibridaciones de VGlut2 o GAD67 se adquirió con un microscopio confocal de escaneo láser Zeiss 510 META, equipado con un láser de iones de argón de 488 nm (Alexa Fluor 488) y acoplado a un Microscopio Axiovert 200 M. Durante la adquisición de las imágenes se mantuvieron constantes los siguientes parámetros: punto de referencia=1, ganancia del detector=750, desplazamiento del amplificador=-1.738, ganancia del amplificador=1, fuente láser= 25%.

El diseño de las figuras para los experimentos con radiactividad o fluorescencia, se realizó con el programa Adobe Photoshop CS6.

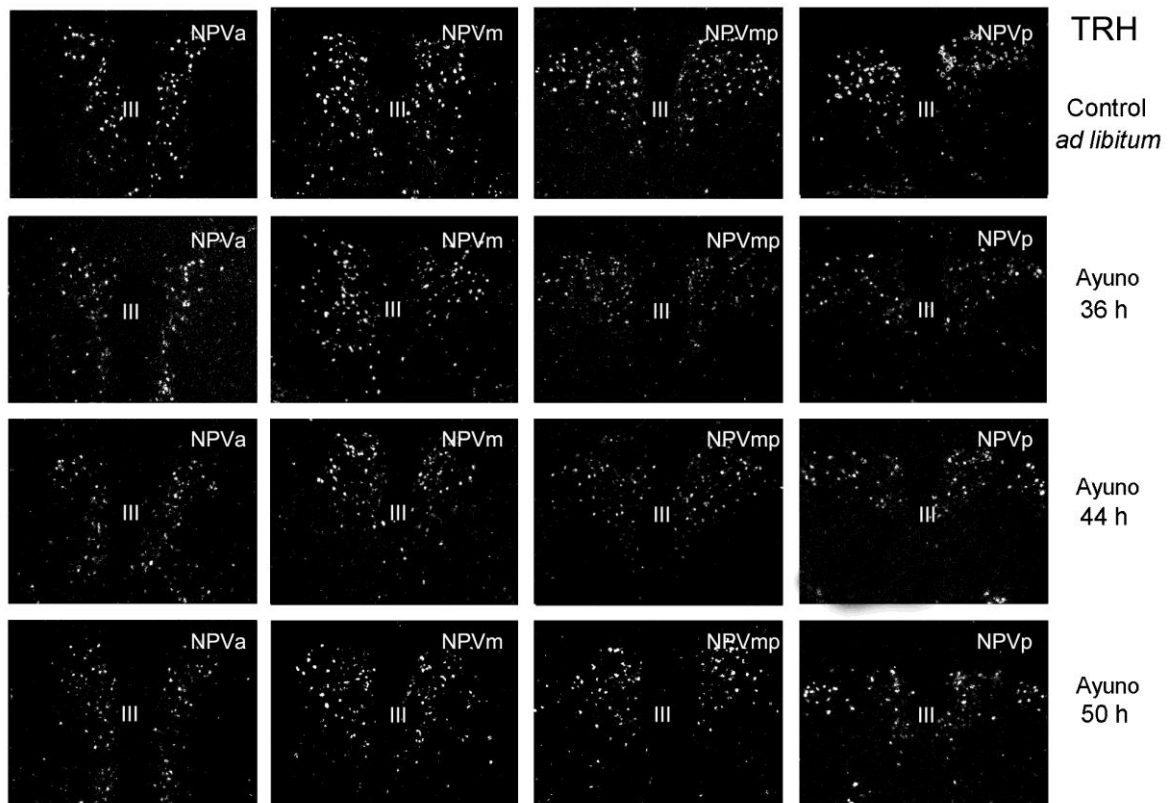
## 7. RESULTADOS

---

### ***7.1 Distribución del ARNm de la TRH por ISH radiactiva en el NPV de animales con ayuno de 36, 44 o 50 h***

Se realizó una curva para evaluar la respuesta de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas a diferentes tiempos de ayuno. Las hibridaciones se hicieron en cortes de cerebro de ratones macho adultos de la cepa C57/BL6/JN a lo largo del NPV, tanto en rebanadas que contuvieron a las neuronas de interés (NPV medio y posterior), como en rebanadas de la zona anterior, que contuvieron neuronas de la TRH no hipofisiotrópicas. El patrón de distribución para el ARNm de la TRH evaluado por *ISH* con una sonda radiactiva marcada con  $^{35}\text{S}$ -UTP, fue similar al reportado previamente en la literatura por Kadar (Kadar y cols., 2010). Las neuronas positivas a la TRH se observaron en todas las zonas parvocelulares del NPV sin importar la condición experimental (Figura 4).

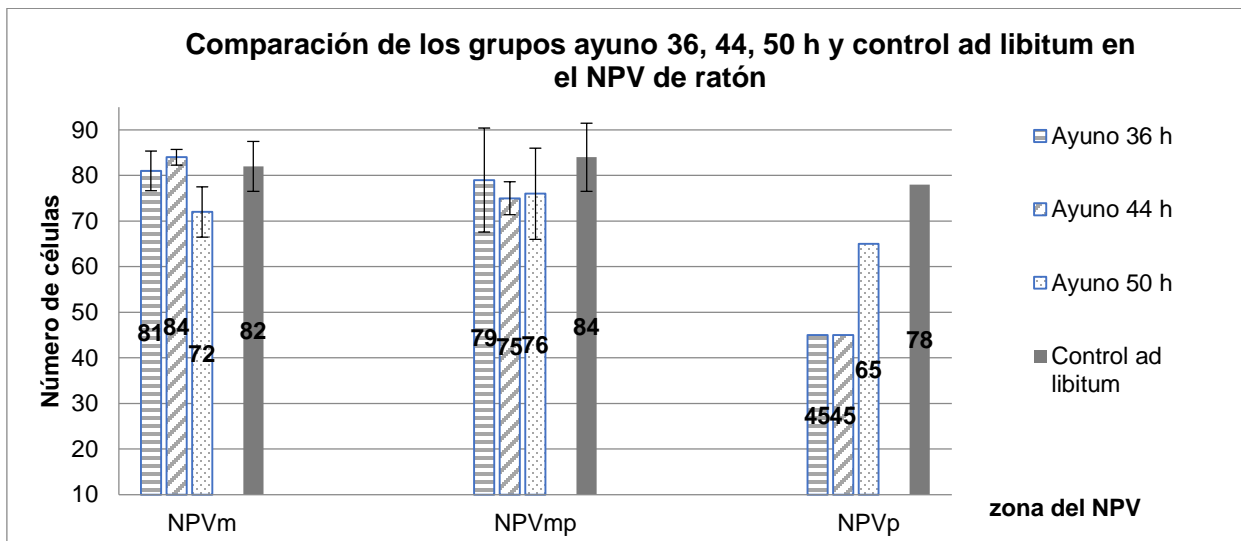
En dirección anteroposterior, las neuronas de la TRH se distribuyeron en el NPV parvocelular anterior (NPVa), medial (NPVm), medial posterior (NPVmp) y en la zona posterior (NPVp), siendo las zonas anterior y medial las que contuvieron un mayor número de neuronas de la TRH alineadas a ambos lados del tercer ventrículo (Figura 4, III). La zona posterior del núcleo contuvo menos neuronas positivas a la TRH y las que se observaron, formaron cúmulos a ambos lados del tercer ventrículo (NPVp Figura 4).



**Figura 4.** Micrografías en campo oscuro de cortes coronales representativos del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) en dirección anteroposterior. Ratonés macho de la cepa C57/BL6/JN en los distintos grupos experimentales: control *ad libitum*, ayuno de 36, 44 y 50 h. El ARNm de la TRH se hibridó con una sonda marcada con  $^{35}\text{S}$ -UTP en cortes coronales de 18  $\mu\text{m}$  de grosor bregma -0.46 a -1.06 mm (George Paxinos, 2001). Las neuronas positivas al ARNm de la TRH se observaron en todas las zonas parvocelulares del NPV sin importar la condición experimental; la zona anterior (NPVa) y medial (NPVm) contuvieron un mayor número de neuronas de la TRH alineadas a ambos lados del tercer ventrículo (III). Los grupos con un ayuno de 36 o 44 h mostraron menos neuronas con señal para el ARN mensajero de la TRH en las zonas medial-posterior (NPVmp) y posterior (NPVp) del NPV en comparación con el grupo control *ad libitum* y el grupo con ayuno de 50 h. III= tercer ventrículo. Ayuno 36 h n=3 ratones; ayuno 44 h n=3 ratones; ayuno 50 h n=2 ratones; control *ad libitum* n=2 ratones.

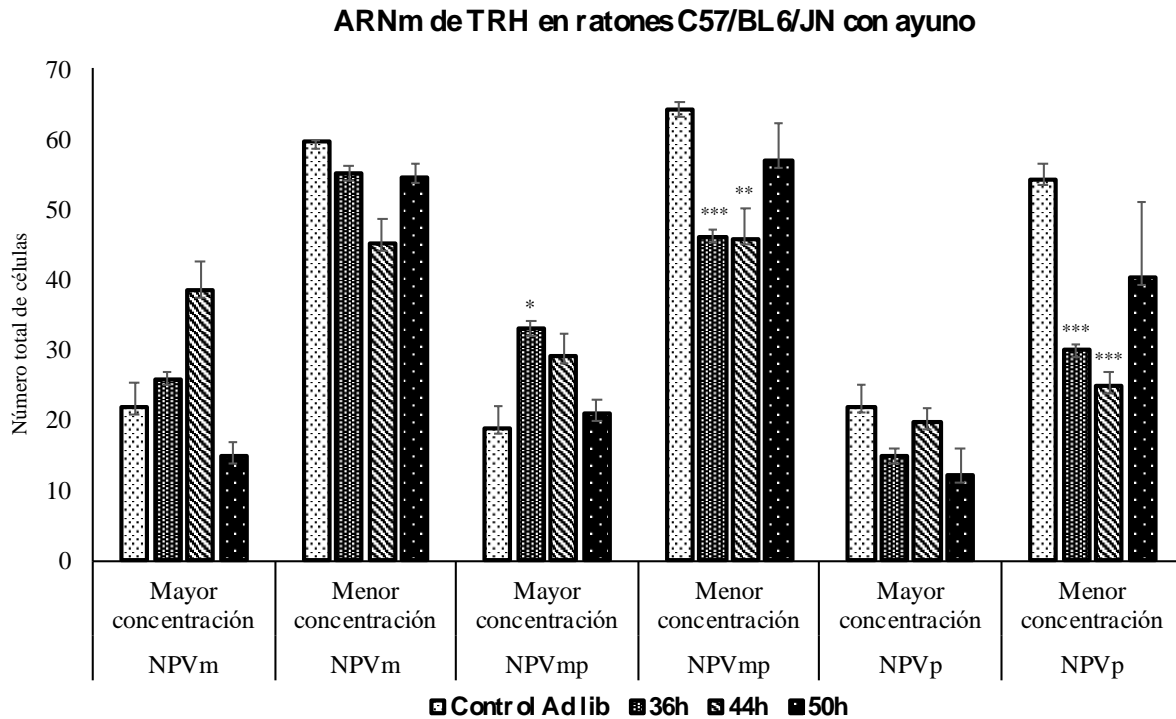
## 7.2 Cuantificación del número total de células positivas al ARNm de la TRH detectado con $^{35}\text{S}$ -UTP en el NPV de animales con ayuno de 36, 44 o 50 h

El ARNm de la TRH detectado con la sonda radiactiva  $^{35}\text{S}$ -UTP, se analizó en el NPV de la región hipofisiotrófica mediante el conteo del número total de células que expresa al mensajero TRH  $^{35}\text{S}$ -UTP. En comparación con el grupo control *ad libitum*, el número total de células fue similar en el inicio de la zona medial (NPVm) y medial posterior del NPV (NPVmp) de todos los grupos y disminuyó considerablemente en la zona posterior de los 3 grupos con ayuno (Figura 5).



**Figura 5.** La gráfica representa el número total de células positivas al ARNm de la TRH marcado con  $^{35}\text{S}$   $\alpha$ -UTP en el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) de ratones macho de la cepa C57/BL6/JN en animales control (agua y comida *ad libitum*) y en los grupos experimentales con ayuno de 36, 44 o 50 h. La señal para la TRH ( $n=6$  cortes por región/animal) se dividió para su análisis en medial (NPVm), medial posterior (NPVmp) y posterior (NPVp) en el bregma -0.46 a -1.06 mm según Paxinos (George Paxinos, 2001). La zona posterior de todos los grupos ayunados muestra un menor número de células en comparación con el grupo control *ad libitum*. Ayuno 36 h  $n=3$ ; ayuno 44 h  $n=3$ ; ayuno 50 h  $n=2$ ; control *ad libitum*  $n=2$ .

Si bien el número total de células positivas al ARNm de la TRH fue similar en las zonas medial (NPVm), medial posterior (NPVmp) de todos los grupos con ayuno (Figura 5), **el análisis en categorías del número de células con mayor y menor concentración** de ARNm de la TRH en la zona hipofisiotrópica, mostró diferencias significativas en las zonas NPVmp y NPVp respecto al grupo control (Figura 6).



**Figura 6. Efecto del ayuno sobre el número de células con mayor y menor concentración de ARNm de la TRH en las neuronas hipofisiotrópicas del NPV.**

La gráfica representa el promedio del número de células con mayor y menor concentración del ARNm de la TRH marcado con  $^{35}\text{S}$  en el NPV de cerebros de ratones macho de la cepa C57/BL6/JN de animales control (comida ad libitum, barras claras) y animales con ayuno de 36, 44 o 50 h (barras oscuras); todos con agua ad libitum. El NPV se dividió para su análisis en medial (NPVm), medial posterior (NPVmp) y posterior (NPVp). Los datos fueron adquiridos con el programa Image J (NIH), graficados con Excel y analizados con ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple Holm-Sidak. Diferencias significativas con

respecto al grupo control de una misma categoría \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . Ayuno 36 h  $n=3$ , Ayuno 44 h  $n=3$ , Ayuno 50 h  $n=2$ , Control  $n=2$ .

### **7.3 Determinación de la cantidad de la sonda de digoxigenina empleada para visualizar los ARNs mensajeros de la TRH, el VGluT2 y la GAD67**

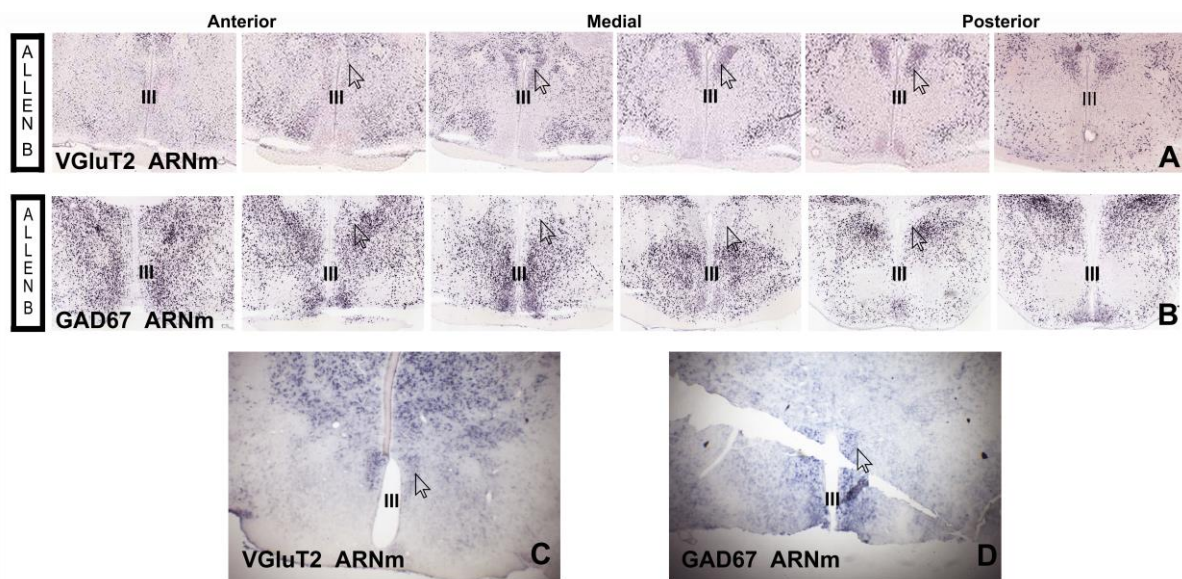
Si bien se emplearon sondas previamente reportadas en la literatura, se realizó una *ISH* de prueba para dilucidar la cantidad ideal para obtener una señal adecuada del ARNm en estudio en los tejidos de ratón, en nuestras condiciones experimentales. Se realizó una curva empleando 3 concentraciones de la sonda marcada con dig-UTP y revelada con Ab dig-fosfatasa alcalina. Se emplearon 1, 3 o 5  $\mu\text{L}$  por cada 60  $\mu\text{L}$  de mezcla de hibridación/laminilla, de las sondas dirigidas a los ARNs mensajeros de la TRH, el VGluT2 y la GAD67 en una concentración de 100 ng/ $\mu\text{L}$ . Se determinó que un volumen de 3  $\mu\text{L}$  correspondiente a 300 ng para cada una de las sondas, es suficiente para obtener una señal adecuada (fuerte y sin saturar) en la *ISH* del NPV de cerebros de ratón (datos no mostrados).

### **7.4 Detección de los ARNm del VGluT2 y la GAD67 por ISH, empleando dig-UTP/fosfatasa alcalina en el NPV de ratonas expuestas a un ayuno de 36 h**

Con base en los resultados de la curva de ayuno en los grupos de 36, 44 y 50 h, se determinó que 36 h son suficientes para alcanzar la inhibición del ARNm de la TRH en el NPV. Con ello, un nuevo grupo de ratonas adultas de la cepa C57/BL6/JN fue sometido a un ayuno de 36 h con agua *ad libitum*, a la par con un grupo control (agua y alimento *ad libitum*), para evaluar la concentración del ARNm del VGluT2 y el ARNm de la GAD67 en el NPV a lo largo de la zona anteroposterior. En un primer set de tejidos, la detección para ambos mensajeros se realizó por *ISH* empleando una sonda marcada con digoxigenina y revelando la señal con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (anti dig-PA). La señal se evidenció por



la precipitación del sustrato para la fosfatasa (NBT-X fosfato; coloración morada) en varias zonas del tejido, incluyendo el NPV, el cual mostró la forma triangular característica del núcleo (Figura 7 C, D). Esta hibridación se realizó en cortes de tejido contenidos en el bregma -0.46 al -1.06 mm según el atlas de Paxinos (George Paxinos, 2001) y se comparó con la reportada en el *Allen Mouse Brain Atlas* ((Lein y cols., 2007)), (Figura 7 A, B). Si bien la señal observada para el VGluT2 o la GAD67 en los cortes de los animales experimentales fue específica para el NPV y otros núcleos del hipotálamo y del tálamo contenidos en el mismo corte, la precipitación no uniforme del sustrato, así como la calidad de los tejidos al final del procedimiento no fue óptima para su análisis y cuantificación.

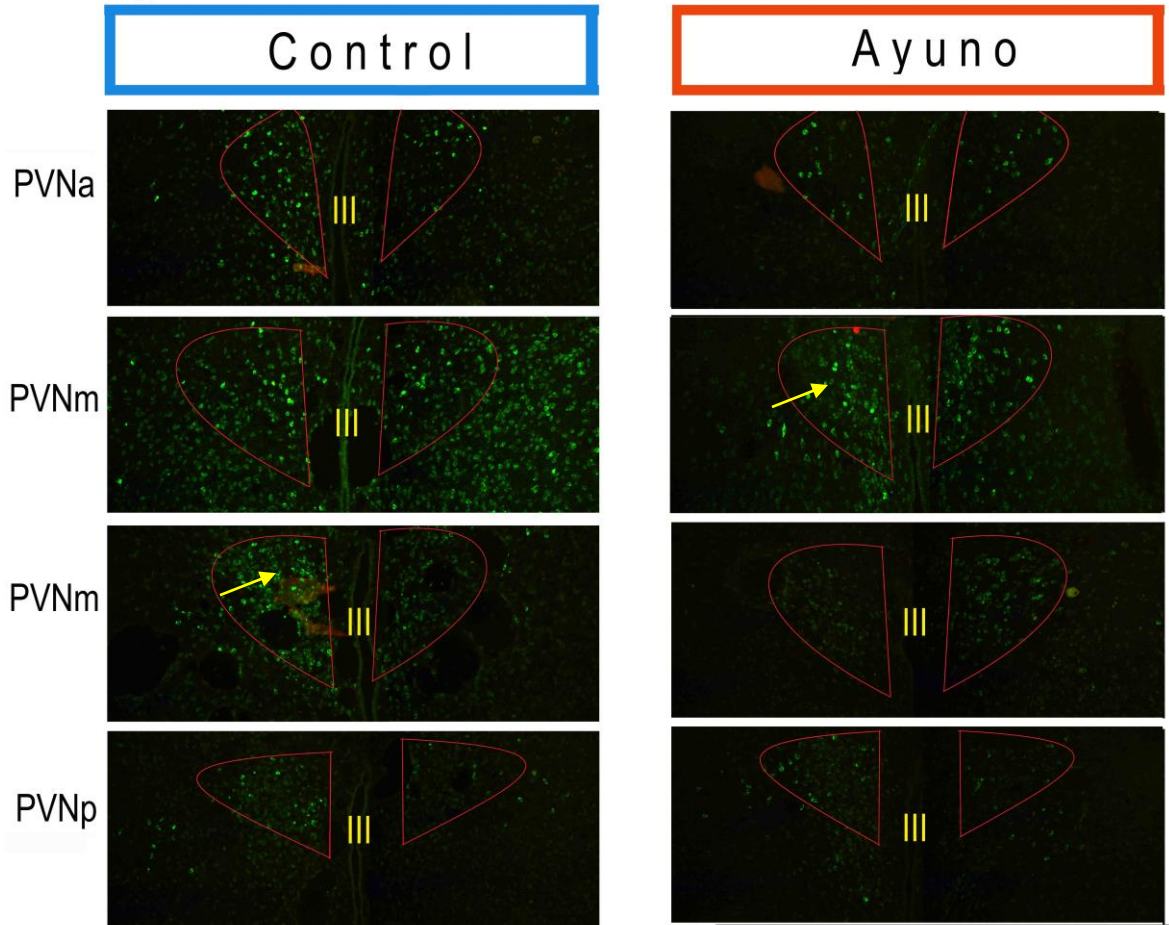


**Figura 7.** A-B, Distribución de los ARNm para el VGluT2 y la GAD67 en el NPV de ratón según el Allen Mouse Brain Atlas (Lein y cols., 2007). A) VGluT2, B) GAD67. C-D, Micrografías representativas en campo claro del NPV de ratonas de la cepa C57/BL6/JN hibridados con una sonda dig-UTP para el VGluT2 (C) o la GAD67 (D) y revelados con anti dig-fosfatasa alcalina/NBT-X fosfato. La punta de flecha señala al ARNm del VGluT2 o al de la GAD67 en las neuronas del NPV en la zona media, III: tercer ventrículo. Amplificación 10X, escala en C-D=10X.

### **7.5 Detección del ARNm de la TRH empleando dig-UTP/ Tiramida-DMSO-Alexa 488 en el NPV de ratones expuestos a un ayuno de 36 h**

Se realizó una tercera hibridación en cortes coronales de la zona media del NPV de ratones macho expuestos a un ayuno de 36 h y en ratones control, empleando como revelador el fluorocromo Alexa 488 y la reacción de amplificación de Tiramida-DMSO. Los tejidos hibridados con la sonda dig-UTP dirigida al ARNm de la TRH y revelados con Alexa 488, mostraron un patrón de distribución similar al observado con la sonda  $^{35}\text{S}$ -UTP (Figuras 4 y 8). La señal fluorescente para Alexa 488 mostró células positivas a la TRH a ambos lados del tercer ventrículo (Figura 8), que disminuyeron en número hacia la zona posterior del núcleo (NPVp) y en intensidad en el grupo de ayuno 36 h con respecto al grupo control *ad libitum* (Figura 8). No obstante, los cortes que llegaron al final del experimento, no fueron suficientes para ser analizados estadísticamente en categorías, como se describió para el experimento con  $^{35}\text{S}$ -UTP en el que se realizaron hibridaciones de todos los cortes de cada animal/ por grupo experimental a lo largo del NPV para tener un número suficiente de cortes/región/animal/grupo experimental.

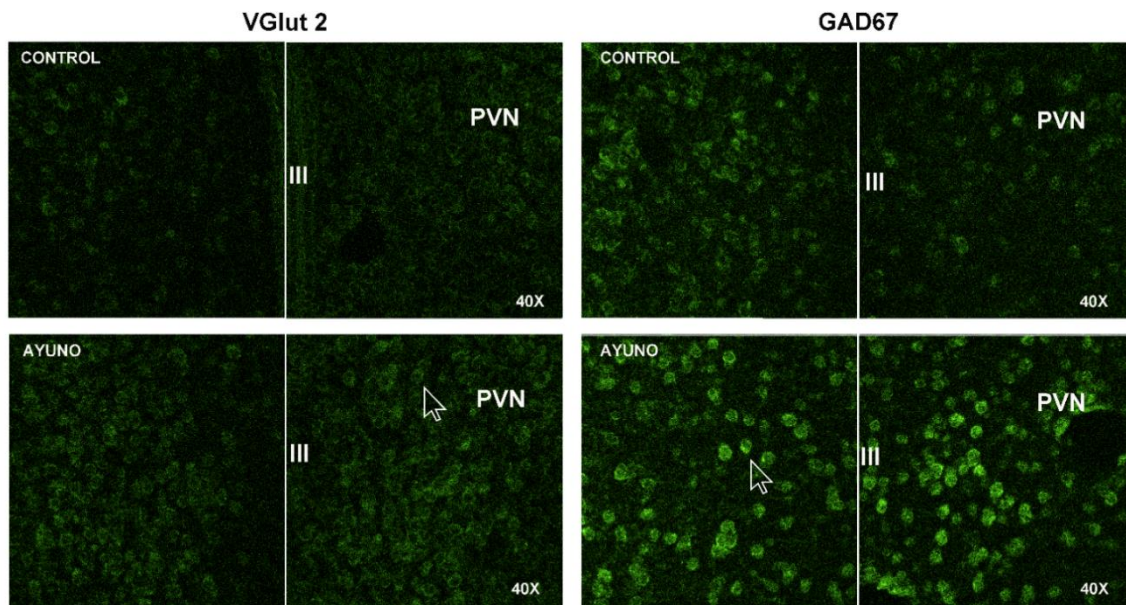
TRH dig-UTP/ Tiramida-DMSO-Alexa 488



**Figura 8.** Distribución del ARNm de la TRH en el NPV de ratones macho con 36 h de ayuno. La señal del ARNm se detectó con un Ab dig-POD y Tiramida-DMSO-Alexa 488. Imágenes representativas de 1 animal control (columna izquierda) y 1 animal con ayuno de 36 h (columna derecha). La flecha señala células positivas al ARNm de la TRH en las neuronas del NPV. La señal fluorescente para Alexa 488 mostró células positivas a la TRH a ambos lados del tercer ventrículo que disminuyeron en número y en intensidad hacia la zona posterior del núcleo (NPVp) en el grupo de ayuno 36 h en comparación con el grupo control. NPVa= NPV anterior, NPVm= NPV medio, NPVp= NPV posterior; III= tercer ventrículo. Amplificación 40X.

### **7.6 Detección de los ARNm del VGlut2 y la GAD67 empleando dig-UTP/ Tiramida-DMSO-Alexa 488, en el NPV de ratones expuestos a un ayuno de 36 h**

A la par con la *ISH* fluorescente de la TRH, se realizó la hibridación para detectar a los ARNm del VGlut2 y la GAD67 en cortes contiguos del NPV del grupo de ratones expuestos a ayuno por 36 h y grupo control, descrito en el apartado anterior. El ARNm del VGlut2 presentó una señal basal baja en el NPV (control del VGlut2, Figura 9), mientras que el de la GAD67 presentó una señal basal mayor a la del VGlut2 tanto en el área del NPV como en las inmediaciones del mismo (control de la GAD67, Figura 9). En el grupo ayuno de 36 h se observó una tendencia al alza para ambos ARNm tanto en el NPV como en las inmediaciones del núcleo (Figura 9), que no pudieron ser analizadas estadísticamente por la pérdida de cortes a lo largo del NPV/ animal/ grupo experimental durante la estandarización de la metodología.



**Figura 9.** Micrográficas representativas de la zona media del NPV de ratones macho de la cepa C57/BL6 sometidos a 36 h de ayuno y control (*Ad libitum*). Los tejidos se hibridaron en cortes coronales de 18  $\mu$ m de grosor con una sonda dig-UTP dirigida al ARNm del VGlut2 o la GAD67; la señal verde fluorescente se detectó

*con un Ab dig-POD/Tiramida-DMSO-Alexa 488. La punta de flecha señala al ARNm de VGluT2 o el de GAD67 en las neuronas del NPV. El ARNm de la GAD67 presentó una señal basal mayor a la del VGluT2 tanto en el NPV como en las inmediaciones del mismo, en los grupos control. En el grupo ayuno de 36 h se observó una tendencia al alza para ambos ARNm tanto en el NPV como en las inmediaciones del núcleo. III: tercer ventrículo. Amplificación 40X.*

## 8. DISCUSIÓN

---

La ingesta de alimentos, la repartición de nutrientes y el estado de saciedad, implican la actividad de neuronas hipotalámicas que integran señales provenientes del sistema nervioso central y periférico, así como señales humorales que mantienen el balance energético (Lopez-Gambero, Martinez, Salazar, Cifuentes, & Nualart, 2019; Wynne, Stanley, McGowan, & Bloom, 2005). Las señales humorales incluyen nutrientes como la glucosa y hormonas como la leptina, la insulina y la grelina, que controlan la actividad de neuronas sensoriales de primer orden en los órganos circunventriculares y de neuronas de segundo orden en el hipotálamo o centros de regulación ascendentes como el tálamo y la corteza cerebral entre otros (Bouret y cols., 2004; Sainsbury & Zhang, 2012).

Entre los sistemas de respuesta neuroendócrinos mejor conocidos, se encuentran las neuronas hipofisiotrópicas de la región parvocelular medial (Pam) del núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo, que producen a la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y participan en la regulación del eje tiroideo, el metabolismo basal y la termogénesis (Fekete & Lechan, 2014). No obstante, los mecanismos moleculares que regulan estos procesos, son complejos y no se conocen del todo.

El objetivo de este trabajo consistió en caracterizar la respuesta de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas ante una condición de balance energético negativo como el ayuno prolongado. El análisis cuantitativo de las neuronas de la TRH, mostró una disminución estadísticamente significativa en la concentración del ARNm de la TRH en la zona medial-posterior del NPV en animales con distintos grados de ayuno prolongado, a la par con una tendencia al alza en la actividad de las neuronas GABAérgicas o las glutamatérgicas de la misma región. Adicionalmente se demostró, que la inhibición de las neuronas de la TRH ocurre en una subpoblación significativa a lo largo de la zona medial-posterior, donde una población de neuronas de la TRH no disminuye la concentración del ARNm de la TRH en respuesta al ayuno.

### ***Inhibición de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas durante el ayuno***

Las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas responden al ayuno prolongado disminuyendo la concentración del ARNm de la TRH en el NPV y la actividad del eje tiroideo tanto a nivel central como a nivel periférico (Boelen, Wiersinga, & Fliers, 2008; Fekete & Lechan, 2014). Tanto en la rata como en el ratón, la concentración del ARNm de la TRH disminuye significativamente a las 48 h (Lazcano y cols., 2015) o a las 36 h (este estudio), pero después de un ayuno mayor (72 h en la rata (Lazcano y cols., 2015)), 50 h en el ratón (este estudio), se recupera a nivel del control basal (Lazcano y cols., 2015), (Figura 6). Dicha inhibición está mediada en parte por la caída de la concentración de la leptina en sangre (Legradi y cols., 1997), por la activación de aferentes orexigénicas del núcleo arcuato sobre neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV (Fekete y cols., 2001; Krashes y cols., 2014) y por el aumento tanto en la producción local de hormona tiroidea como en la degradación de la TRH activa en el hipotálamo medio basal (HMB) (Lazcano y cols., 2015), el sitio en donde yacen las terminales nerviosas de neuronas de la TRH que liberan su contenido hacia el sistema portal-hipofisario para regular la actividad del eje tiroideo.

La recuperación de la concentración del ARNm de la TRH durante el ayuno prolongado está menos documentada, sin embargo, podría estar relacionada con la habituación de los animales al estrés que conlleva adaptarse a esa condición de balance energético negativo. Lazcano y colaboradores reportaron, un aumento en la concentración sérica de corticosterona, 48h después de iniciado el ayuno en la rata y el regreso a la concentración basal con referencia al grupo control, a las 72 h del ayuno, a la par con una recuperación tanto en la concentración del ARNm de la TRH en el NPV como del péptido activo en las terminales nerviosas del HMB (Lazcano y cols., 2015). No obstante, la actividad general del eje permanece inhibida, recuperándose en su totalidad hasta 24 h después de que el animal ha reiniciado la reingesta (Sanchez y cols., 2008). Una interpretación adicional considera la reactivación parcial del eje tiroideo durante el ayuno prolongado, para

mantener las demandas energéticas (regulación basal de la temperatura, actividad celular, entre otras) y la sobrevivencia del organismo.

### ***Consideraciones metodológicas***

Los datos mostrados en el presente trabajo consideran la respuesta de ratones macho de la cepa C57/BL6/JN a un ayuno prolongado. En estudios piloto realizados a lo largo de este proyecto, se analizó la respuesta del ARNm de la TRH al ayuno tanto en hembras como en machos sin embargo, al igual que lo reportado en ratas hembra (Jaimes-Hoy y cols., 2016), o en ratonas de la misma cepa (Sánchez E., y cols., en prensa), la inhibición del eje tiroideo fue menos robusta y en algunas hembras incluso no significativa (datos no mostrados) por lo que el estudio se enfocó en ratones macho.

Los resultados en las hembras, evidencian una respuesta desigual que pudiera estar condicionada por cambios en la expresión del ARNm de la TRH, debidos al ciclo estral, al estrés diferencial entre hembras y machos o bien a factores de naturaleza desconocida (Uribe RM et al., 1991; Joseph-Bravo et al., 2020). Por lo que, estudiar el efecto del ayuno en hembras cicladas a la vez que se preservan las condiciones en las que se evitan factores de estrés como ruido, sobre manipulación y aislamiento, podría apoyar los resultados obtenidos en los machos.

Si bien las hembras empleadas para estas hibridaciones no fueron cicladas, consideramos importante dejar esta evidencia para proyectos futuros.

En cuanto a la técnica, la detección para VGlut2 y GAD67, se realizó por *ISH* donde la señal se evidenció con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina (anti dig-PA), las células positivas al mensajero se observaron con una precipitación del sustrato, sin embargo, esta no fue uniforme, además de la falta de calidad en los tejidos al final del procedimiento no fue óptima para su análisis y cuantificación.



Actualmente en el laboratorio se está migrando de técnica para hibridar, de una *ISH* realizada con una sonda marcada con  $^{35}\text{S}$ -UTP, donde la señal positiva se evidencia por una precipitación de los granos de plata contenidos en la emulsión fotográfica, a una hibridación fluorescente (*FISH*). Este trabajo muestra que la *FISH* es lo suficientemente sensible como para detectar cambios a la baja en la concentración de ARNm de la TRH, comparables a lo observado en las hibridaciones radiactivas (Figuras 4 y 8). Diferencias en la concentración de ARNm a lo largo del NPV, como lo observado en las zonas anterior parvocelular, medial y medial posterior en el ratón (Figuras 4 y 6) o en la rata (Sanchez y cols., 2001), son apreciadas en la hibridación fluorescente (Figura 8).

Por el contrario, la detección de las sondas marcadas con dig-UTP y reveladas con el sustrato colorido (BCIP/X-fosfato) para la fosfatasa alcalina (Figura 7), mostró precipitación desigual del sustrato entre hemisferios de una misma rebanada, lo que imposibilitó el análisis de los ARNm de interés. El uso de papel Parafilm® en los pasos de incubación con el anticuerpo Ab dig-PA o la incubación con el sustrato BCIP/X-fosfato en vez de cubreobjetos con gomas que permiten un mayor volumen de incubación, podría eliminar este artefacto, sin embargo, contar con el sistema alternativo de revelado Tiramida-DMSO-Alexa 488 que además amplifica la señal, fue una mejor opción para la detección del ARNm de la TRH cuya señal disminuye en respuesta al ayuno.

### ***Regulación de neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas durante el ayuno en el NPV***

La GABA y el glutamato son los neurotransmisores inhibitorio y excitatorio por excelencia. Como se mencionó anteriormente, el glutamato es el neurotransmisor excitador más abundante en el SNC y más del 50% de todas las sinapsis en el SNC lo liberan (Dale Purves, 2008). Si bien el glutamato es precursor en la síntesis del GABA, el dogma central menciona que una neurona sólo puede sintetizar uno u

otro neurotransmisor, lo que define la naturaleza de esa neurona como excitatoria o inhibitoria, pero no ambas.

Para definir la naturaleza de las neuronas GABAérgicas o glutamatérgicas en el NPV, empleamos como marcadores de actividad de esas neuronas al transportador vesicular de glutamato 2 (VGluT2) y a la enzima glutamato descarboxilasa (GAD) isoforma 67 (GAD67), que además de ser expresados en el NPV (Bowers y cols., 1998; Hrabovszky & Liposits, 2008; Takamori y cols., 2001), se sintetizan en neuronas de la TRH de la región hipofisiotrópica (Hrabovszky y cols., 2005) o bien modifican la actividad de las mismas (Fekete y cols., 2002; Ghamari-Langroudi y cols., 2010; Wittmann y cols., 2005).

Contrario a lo esperado, la exposición a un ayuno prolongado de 36 h, mostró una tendencia al alza en la concentración del VGluT2 en las neuronas glutamatérgicas, y de la GAD67 en las neuronas GABAérgicas del NPV (Figura 9). La propuesta inicial contempló la hipótesis de que todas las neuronas TRHérgicas del NPV coexpresan al VGluT2 y por lo tanto son excitatorias. En este contexto, la caída en la concentración de la leptina en el plasma debida al ayuno, favorece el aumento de la actividad de las neuronas orexigénicas del núcleo arcuato como NPY/AgRP/GABA (Krashes y cols., 2014) que inervan a las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV (Fekete y cols., 2001; Mihaly y cols., 2000), e inhiben la actividad de estas neuronas. Sorprendentemente, identificamos dos categorías de neuronas de la TRH en la región hipofisiotrópica del NPV, una que no fue susceptible al ayuno prolongado en ninguno de los tiempos analizados y otra que disminuyó la concentración del ARNm de la TRH en respuesta al ayuno (Figura 6). Este resultado abre la posibilidad de que algunas neuronas de la TRH de la zona medial sean glutamatérgicas-sensibles al ayuno y otras GABAérgicas no responsivas al ayuno, aunque ambas sean hipofisiotrópicas dado que más del 97% coexpresa al péptido CART (marcador hipofisiotrópico) tanto en la rata (Fekete, Mihaly, y cols., 2000) como en el ratón (Kadar y cols., 2010). No obstante, la naturaleza de estas neuronas tendrá que ser caracterizada con mayor profundidad. Una sola neurona de la TRH puede expresar receptores tanto a glutamato como a

GABA, además de ser de naturaleza GABAérgica o glutamatérgica. Igualmente, puede coexpresar a otros péptidos implicados en la regulación de la ingesta como el CART, el PACAP o la neurotensina (Fekete, Mihaly, y cols., 2000; Gotoh y cols., 2013; Krashes y cols., 2014), lo que aumenta la complejidad de la respuesta.

## 9. CONCLUSIONES

---

La naturaleza de la respuesta de las neuronas TRHérgicas del NPV es compleja y depende de la coexpresión de otros péptidos, neurotransmisores y receptores en las distintas subdivisiones del NPV, además de la innervación diferencial originada en distintos núcleos hipotalámicos, en el tallo cerebral u otras regiones del SNC y de factores humorales de la circulación o de las interacciones glía-neurona, por nombrar algunos. Adicional a la regulación negativa por las hormonas tiroideas o positiva por la leptina descritas con detalle en la literatura, este trabajo contribuye con un elemento más en la complejidad de la respuesta de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas al ayuno prolongado.

En este trabajo se demostró que existe una inhibición del ARNm de la TRH en una subpoblación de neuronas de la TRH en el NPV, a diferentes horas de ayuno prolongado en ratones, y que la síntesis de los neurotransmisores GABA y glutamato podría estar aumentada en el NPV. Concluimos que las neuronas TRHérgicas hipofisiotrópicas del NPV responden de manera diferencial al ayuno prolongado y que la actividad de las neuronas GABAérgicas como de las glutamatérgicas es necesaria para mantener la homeostasis energética en una condición de balance energético negativo como es el ayuno prolongado. Por lo que, es necesaria la búsqueda de marcadores múltiples para determinar la respuesta individual de estas neuronas.

## 10. PERSPECTIVAS

---

La caracterización molecular de las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV es de vital importancia para comprender los circuitos centrales que se activan en respuesta a una demanda de energía en condiciones de balance negativo como el ayuno prolongado. Dado que no todas las neuronas de la TRH de la región hipofisiotrópica presentan inhibición en la concentración del ARNm de la TRH en respuesta al ayuno, la pregunta que surge a partir de este estudio es si las neuronas responsivas son de naturaleza glutamatérgica y además tienen receptores al GABA; ello explicaría el patrón inhibitorio observado en una subpoblación. Si bien se ha descrito con detalle en la rata la presencia de receptores a los péptidos orexigénicos (el NPY y el AgRP) u anorexigénicos (el  $\alpha$ -MSH) del núcleo arcuato, así como la inervación de los mismos sobre neuronas de la TRH del NPV, la siguiente pregunta sería conocer si sólo las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas del NPV responsivas al ayuno, reciben aferencias del núcleo arcuato o si mecanismos adicionales como la presencia de un receptor al GABA, se requieren para que sólo parte de la población sea inhibida en esta condición.

El péptido CART podría ser un marcador útil debido a que coexiste con neuronas de la TRH hipofisiotrópicas, pero no con neuronas de la TRH autónomas del NPV. El marcaje triple para el ARNm de la TRH y el CART, a la par con la del ARNm del receptor GABA-A gamma2 que se activa en respuesta a estrés, podría ser una herramienta útil para identificar una de las vías de respuesta de éstas neuronas.

Adicionalmente, se requiere caracterizar la naturaleza de las neuronas GABAérgicas y glutamatérgicas que se activaron en el NPV durante el ayuno prolongado y la relación que guardan con las neuronas de la TRH hipofisiotrópicas responsivas al ayuno. Es posible que una interneurona GABAérgica module la respuesta de una neurona de la TRH+/glutamato+ o bien que la respuesta sea la suma de aferencias GABAérgicas del mismo NPV más la suma de aferencias del hipotálamo y/o de regiones responsivas extra hipotalámicas del SNC.

La naturaleza glutamatérgica de las neuronas de la TRH del NPV (autónomas y endócrinas), ha sido dilucidada con anterioridad en la rata, sin embargo, se

desconoce si parte de estas neuronas presenta una respuesta heterogénea al GABA o no. Por ello, el marcaje triple para la TRH, el VGluT2 y el GABA-A gamma2, podría esclarecer la respuesta diferenciada de ésta subpoblación al ayuno.

Adicionalmente, sería de utilidad medir la concentración de la grelina, la leptina y las hormonas tiroideas en la sangre, a los tiempos de ayuno reportados en este trabajo para conocer el contexto fisiológico en el que se encuentra el animal.

## 11. ANEXOS

### *Anexo 1: Soluciones*

- **Amortiguador A (1 L):** 100 mL de Tris-HCl pH 7.6 + 30 mL de NaCl 5 M aforar a 1000 mL con agua *in situ*.
- **Amortiguador de ARNsas (1 L):** 292.2 g de NaCl + 100 mL de Tris-HCl pH 8.0 + 20 mL de EDTA pH 8.0, aforar a 1000 mL con agua *in situ*.
- **EDTA 0.5 M pH 8 (500 mL):** 93.05 g de EDTA + lentejas de NaOH para ajustar pH, aforar a 500 mL con agua *in situ*.
- **SSC 20x (1 L):** 175.32 g NaCl + 88.23 g de Citrato de sodio dihidratado granular, aforar a 1000 mL con agua *in situ*.
- **TBE 10x:** 108 g de Trizma base + 55 g de ácido bórico + 40 mL de EDTA 0.5 M pH 8.0, aforar a 1000 mL con agua *in situ*.
- **Tris-HCl pH 8.0 o pH 7.6 (1 L):** 121.1 g de Trizma base + HCl concentrado para ajustar pH, aforar a 1000 mL con agua *in situ*.
- **PFA (100 mL):** 4 g de paraformaldehído + 60 µL de NaOH 10 N, aforar a 100 mL con PBS 1X.

Preparación de Paraformaldehído: Calentar en un horno el PBS 1X y pesar el paraformaldehído en papel aluminio, el siguiente procedimiento se realiza en una campana de flujo laminar. En una parrilla y con agitación encendida, colocar un vaso de precipitados con PBS 1X, agregar NaOH 10N y por último el Paraformaldehído. Ya disuelto, se coloca el vaso de precipitado en hielo.

#### ➤ **Cámara húmeda**

Colocar un colchón de papel Kimwipes a lo largo de la caja del rack's para portaobjetos, humedecer papel Kimwipes con formamida al 50%/ SSC (2 mL de SSC 20X + 10 mL de formamida + 8 mL de H<sub>2</sub>O) y colocarlos a lo largo de los racks's poner encima parafilm cubriendo toda la superficie con Kimwipes. Picar los trozos de parafilm con una aguja. Aquí se van colocando las laminillas que contienen la mezcla de hibridación, esta caja se cierra y se mete al horno a 54°C toda la noche para llevar a cabo la hibridación.

- **Amortiguador de ARNsa A al 10X (1L):** 29.22 g de NaCl + 10 mL de Tris 1M pH 8.0 + 2 mL de EDTA 0.5 M, aforar con H<sub>2</sub>O Mili Q).
- **PBS 10X para ICC (Stock, 1L):** [0.1 M de PB + NaCl al 9%]  
Disolver 90 g NaCl en aproximadamente 500 mL de H<sub>2</sub>O *ISH*; adicionar 100 mL de PB 1M (Sigma, Cat P3619); aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O *ISH*.
- **PBT 10X:** 100 mL de PBS 10X + 1 mL de tween 20, aforar a 1 L con H<sub>2</sub>O *in situ*.
- **Tyramida-DMSO:** 150 µL de DMSO del estuche (se debe atemperar 1 hora antes de usar) + 1 frasco de Tyramida marcada con Alexa 488 del estuche (frasco único). Hacer alícuotas de 10 µL y almacenar a -20°C en un frasco protegido de la luz hasta su uso. Cada alícuota es útil para 16 laminillas aproximadamente.
  - **Frasco 3:** 200 µL del frasco 1 (amortiguador de amplificación) + 1 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (frasco 2).
  - **Frasco 4 o solución de trabajo:** 297 µL del frasco 1 (o amortiguador de amplificación) + 3 µL del frasco 3 + 3 µL de Tyramida-DMSO por cada 6-7 laminillas



## **Anexo 2:** Material y H<sub>2</sub>O empleados en las hibridaciones *in situ* fluorescentes

El material de vidrio que se utilizó para preparar y almacenar las soluciones para las hibridaciones *in situ* fluorescentes, se horneó a 100°C durante al menos 12 h. El material sensible temperatura alta por periodos prolongados se esterilizó por calor húmedo durante 30 min en una autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión.

Todas las soluciones utilizadas en la *FISH*, incluidas las empleadas para la linearización de plásmidos o la transcripción *in vitro*, se prepararon con agua milli Q, calidad tipo I (18 MΩ.cm), colectada en botellas horneadas y esterilizada por calor húmedo durante 30 min a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión (*H<sub>2</sub>O-ISH*). Las soluciones empleadas en todos los protocolos fueron filtradas con filtros millipore de 0.22 μm de diámetro y esterilizadas por calor húmedo antes de ser utilizadas, para eliminar la posible presencia de bacterias y/o ARNasas introducidas accidentalmente en los frascos o contenedores de los reactivos a emplear, mediante el uso de guantes contaminados durante el proceso de preparación.

**Anexo 3:** Secuencia del plásmido con número de registro BC053493.1 de 741 pb de la secuencia del ADNc que codifica para la TRH, fragmento complementario de la base 106-846.

```

1 ggattctgga gccttcgaga ctctaccag ccagtttgca ctcttcggct cagcatcttg
61 gaaagctctg cagagtctcc accttcgaga ctccaagatg cagggaccctt ggctgatgat
121 ggctctggct ttgatcttcg tgctaactgg tatccccaaa tcctgcccct tgctggaagc
181 agcccaggag gaagggtcctg tgactcctga cttccaggc ctggagaaag tccaggtccg
241 gccagaacgt cgattcttga ggaaagacct ccagcgtgtg cgaggggacc ttggtgctgc
301 cttagattcc tggatcacia aacgccagca tccgggcaaa agggaggaga agttggaaga
361 cgaagccgaa gagaggggag atttgggaga agtgggagcc tggagacccc acaaacgaca
421 gcaccctggc cgacgtgcca accaagacia ggattcatgg tcagatgagg gggacagtga
481 ctggctgccc ccgtcctggc taccagattt cttctggat tcctggttct cagatgcccc
541 ccaagtcaag cggcagcacc ctggcaggcg atccttccc tggatggagt ctgatgtcac
601 caagaggcag catccaggcc ggaggttcat agatcctgag ctccaaagaa gctgggaaga
661 aacagaggga gaggagggtg gcttaatgcc tgagaaact cagcatcctg gcaaaagggc
721 agtgggtcac ccttggtggc cccaggggat ttgtggcaca acaggcctgc tccagcttct
781 aggtgacctg agtaggggcc aggagacctt ggcaagcaa accccacaac tggaaacctg
841 ggtcagggaa cctctggagg agtaaggtta ggtcaggct ttaggtctag gctgatgtaa
901 gccctgtgta tcctatcca gtcccttcac tggtttctt cttagatgct aaccctgggc
961 cctctgtaca tagcatccac ccaaaccctt cccttaccca cttcaggaac ttcaaagagc
l021 caatcaggaa gttaaaacc tacttatccc ttcaagcaag gagggtggggg cccctcttct
l081 ctgacagccc cacagtctct cacccttcc aactggcca agacggttct tccacgctc
l141 ctaagggacc tcctcagaaa gggtaggatt gaaaagttg ggtgttaaaa tccaacttct
l201 gtcacttgcc ccatatggca agactgacct ggtataactt cagcgcattc tccaaggttg
l261 ggggccctaa gcagtttggg ggatattcag atatgttggg gggggtcaca tcttgatat
l321 aaccctgctc ttgttaatct caatgacaat aaaatatac caggtcaaaa aaaaaaaaaa
l381 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

**Anexo 4: Secuencia del plásmido con número de registro NM\_017007.1 de 879 pb de la secuencia del ADNc que codifica para el VGlut2, fragmento complementario de la base 522-1400.**

```

1 agacagtaag gttcttttgc tttttccct tacacaagga ttcgatgacg tttttgctca
61 atctgattaa aagacagcgg atttggttgc gttaagactt caaaaccggg aatttacggt
121 gtttttcggt gaggtgactt ccagaacggg gactcatcag caccgccca aataccacgg
181 cactgcgcgc gccctcggcc accggatcct cccttccaa tgagactttg tgactgtgtg
241 taccaattct cctattagga aaccctgggg ctgaatgcag ctattccggt gactctctt
301 tctcgtctct cctcccctct ccaactcaca gccttgctga aaagctcctc tctgctgaga
361 agaaaacggt ctaccttaac ctattaagac tatgcgcaga actgccttt catagccatc
421 acaattttaa tctgtaagc ctggacaga gtctttaca gaatggagtc ggtaaaaca
481 aggattttgg ccccggggaa agaggggata aagaattttg cftggaaaatc cctcggacag
541 atctacaggg tctggagaa gaagcaggat aaccgagaga ccctcagct gacagaggac
601 ggcaagcccc tggagggtgc tgagaagaag gctccgctat gcgactgtac gtcttccggc
661 ctgccgcgcc gctacatcat agccatcatg agcggcctcg gcttctgcat ctcttttgg
721 atcccgctga acctgggtgt ggccattgtg gacatggta caacacagca cctccacgg
781 ggtggcaag ttatcaagga gaaagccaag tttaactggg accccgagac tgtggggatg
841 attcacgggt cgttctctg gggctatatc atcacgcaga ttccggcggc atacatcgca
901 tgcgactgg ctgtaaccg ggtctttggg gctgccatac tgcttacct taccctcaat
961 atgtgatcc catctgcagc cagagtgcac tatggatgag tcactttgtg tagcaatttg
1021 caaggacttg tggaggcgt cacctacca gcctgtcacg ggatattggag caagtgggcc
1081 cctcctttgg agaggagtag gttggctacc acctcctct gtggttccca tgctggagca
1141 gtcattgcaa tgcccctagc tggatcctg gtgcagtaca ctggatggtc ttcagatttt
1201 tacgtatatg gaagctttgg tatggctgg tatatgttct ggcttctggt gtcttacgag
1261 agccccgcaa agcatccaac cataacagac gaagaacgta ggtacataga agagagcatc
1321 ggggagagcg caatctgtt aggagcaatg gagaaattca agaccccatg ggggaagttt
1381 ttcacatcca tgcccgtcta tgcgataatt gttgcaaat tctgcaggag ttgactcttt
1441 tatttactgc tcatcagta accagcttat ttcgaggagg tttttggatt tgaatcagc
1501 aaggttggca tgtgtctgc ggtcccacac ctggtcatga caatcattgt gcctatcggg
1561 gggcaaatg cagactttct aaggagcaag caaattcttt caacaactac agtgcgaaag
1621 atcatgaact gcgggggttt tggcatgaa gccacactgc tctggtgtg ttgctactct
1681 catactagag gggggccat ctcttcttg gtgcttcag tgggattcag tggatttct
1741 atctctggtt tcaatgtgaa ccacttggat attgcccga gatatgccag tatcttaatg
1801 ggcatttcaa atggtgttg cacgctgctg ggaatggtct gcccgatcat tgttggtgca
1861 atgacgaaga acaagtcccg tgaagaatgg cagtatgtct tctctatcgc ttgactgtc
1921 cactatggtg gactcatatt ttatgacta tttgcctcag gagagaagca accttgggca
1981 gacctgaggg aaacaagcga agaaaagtgt ggcttcattc atgaagatga actggatgaa
2041 gaaacggggg acatcatca gaattacata aattacggta ccaccaaatc ctacggcgcc
2101 acctcacagg agaacggagg ctggcctaac ggctgggaga aaaaggaaga attgtgcaa
2161 gaaagtgcgc aagacgcgta ctctataag gaccgagatg attattcata acgaagctag
2221 ttgctggatt cttttgtagt gtttgtgatt aaattaattg tgaatgcaca aaatcatttt
2281 aagaatgtg gtgtaaacat gtaaacacat caaccaagca agtcttctgt ttcaaaaaat
2341 aataataata tgaattcaaa acagaccgtg agagtccat caagtgcact ctgtgcggc
2401 agtcacgta cgccatttcc attcaggcca ttcgctcttt tctgtttgta ttaaaaggtt
2461 tctctagtaa ataagtaggt attcgttga tccatacca cgttagagag tacaactaca
2521 acagttggca catgtcatcc tacggaagtt aggaagccaa agctactgga tattgtgaac
2581 tgcatttatt tatttattac actggactgc aaaatatccc agggaaatc tgcttagaga
2641 catagtagaa ctgaaaagat ggctagattg ggtactgacg ataactattg tgtgtatct
2701 atggagtgcc tatatctttt aattggagaa ctatattgta tagctagcaa aattgtactg
2761 aattattact aggaatgcac agtgtgtgat attttggat ctccaagaa ctatcttgc
2821 agtgttttgt gaaacgcttg ggcacaaaca cttattttta tgaacaagag cttgtaagg
2881 gagagtagat ctccatgctc tccattcac tacctgacag tatcaaacct tcacatttca
2941 atgaaatcca acgtccatgt aacatcac atgacttttt ttgcaaaaaa gaatataaga
3001 agaaatgac ttcaatgtat tttttattac aactttgtac tggttgtaac ttgcattagg
3061 aaaaatgatt aatataatgta taatcgtaaa gaatctaata aaaatttact atgaagatat
3121 agcccttaaa atgcaatatt aacaacaaaa atatatagaa aatttagata atcttctctg
3181 ataactagag actatatgga actcacacca caaagctata tataatagaa aaagataaac
3241 aatagagatt gtatatgtag acgattttat gacctaatgt cccatttaag aggtattttg
3301 cttgagtata tagtacaag tatattaaaa ttatatctac atcccctgtat atcttataca
3361 tatccactca cacaaacata acaaaactt ttcacacaga accaaaaaca agcataacc
3421 taatgttggg tttggggatt gcaatttcta ctttcataga gtcatagaat tttagatggg
3481 aaaaaaaag gcattttgct cgtcatttct taatataatt aattcaacag gagctcaac
3541 atttgtgtac caagcaataa gtgcgaagca taaacctgct gttgtgtaac tatcccata
3601 ctgcttggg tagcactgat ttctttcttt taaagaactt aacatcggag ctctttaca
3661 tgttttgcgc tgataagaat gcacatcca atttaacgca aagtgtcacc tgggtgtgtt
3721 acctgtctgt tttgggtatt tggctgtttt ggtgtcctgt gctcttgact ggaggccctg
3781 ctactgcgaa tataaaacgt gaagtttgtt tctaaatgca aaccactcct gaccttaaga
3841 aactaaagtc cctctctgct ttgtgtctcc aagtactatc atgtgacct aaccttgc
3901 gtgctgagta aaaagatgtg aactgtcatt ttgttctgc gaagcaagt ttaataaaat
3961 gttctattta aaaaaaaaaa aa

```

**Anexo 5:** *Secuencia del plásmido (número de registro en el Gene Bank NM\_017007.1) de 535 pb que corresponde al fragmento del ADNc de la base 232-769 para la GAD67.*

```

1  gaattccgaa gcagccccgg ggtgacaccc agcacgtacg tctgtggcag agcaaagcca
61  agcggggggac gttcgcggag gagtgcggg agggtccagc tcctgtggc tgaatcgagc
121 cegttcctgc gccagaccg cgggggacac ttgaacagta gagaccccaa gaccaccgag
181 ctgatggcat cttccacgcc ttcgcctgca acctcctcga acgcgggagc ggatcctaata
241 actaccaacc tgcgtcctac aacatatgat acttgggtgt gcgtagccca tggatgcacc
301 agaaaaactgg gcctgaagat ctgtggtttc ttgcaaagga ccaatagcct ggaagagaag
361 agtcgtcttg tgagcgcctt cagggagagg caggcctcca agaactgctt tcctgtgaa
421 aacagtgacc ctggtgcccc cttccggcgc acagagacgg acttctccaa cctgtttgct
481 caagatctgc ttccagctaa gaacggggag gagcaaaactg tgcagttctt actggagggtg
541 gttgacatac tcctcaacta tgtccgcaag acgtttgatc gctccaccaa ggttttggac
601 ttccaccacc cacaccagt gctggaaggc atggaagggt ttaatttggg gctgtctgac
661 caccaccgag ctctggagca gatcctggtt gactgtagag acaccctaaa gtacgggggtt
721 cgcacaggtc acctcgggtt tttcaaccag ctctctactg gtttggatatt cattggttta
781 gctggcgaat ggctgacatc aactgccaat accaatatgt tcacatatga aattgcaccc
841 gtgtttgttc ttatggaaca gatcacactt aagaagatgc gagagatcat tggatgggtca
901 aataaagatg gtgatgggat attttctcct gggggagcca tatccaacat gtacagcatc
961 atggcggctc ggtacaagta ctttccagaa gtgaaaacaa aaggcatggc gctctgccc
1021 aaactggtcc tcttcacctc agaacacagt cactattcca taaagaaggc tgggctgctg
1081 cttggctttg gaactgacaa tgtgatcctg ataaagtgca atgaaagggg gaagataatt
1141 ccagctgatt tagaggcaaa aattcttgat gccaaacaaa agggatttgt tcccctttat
1201 gtcaatgcaa ccgcaggcac gactgtttat ggagcgtttg atccgatcca ggagattgca
1261 gacatatgtg agaaatacaa ctttggctg catgtggatg ctgcctgggg tgggtgggctg
1321 ctcatgtccc ggaagcatcg ccacaaactc agcggcatag aaagggccaa ttcagtcacc
1381 tggaaacctc acaagatgat ggggtgtgctg ctccagtgtt ctgccatcct ggtcaaggaa
1441 aagggtatac tccaaggatg caaccagatg tgtgcaggct acctcttcca gccagacaag
1501 cagtatgacg tctcctacga tacagggggc aaggcgattc agtgtggccc ccatgtggag
1561 atcttcaagt tctggctgat gtggaagca aagggcactg tgggatttga aaatcagatc
1621 aacaaatgcc tggagctggc tgaatacctc tatgccaaga ttaaaaacag agaagagttt
1681 gagatgggtt tcaatggtga gctgagcac acaaatgtct gtttctggta cataccacaa
1741 agcctccgag ggggtccaga cagccctgag cgacgagaaa aactacacag ggtggtccc
1801 aagatcaaag ccctgatgat ggagtcagga acaaccatgg ttggttacca gcctcaaggg
1861 gacaaggcca acttcttccg gatggtcatc tccaaccag ccgccacca gtctgacatc
1921 gatttctca tcgaggaaat agagaggttg ggtcaagatc tgtaatcccc ccccctttgc
1981 agaaccgtaa tcaccggcca tagccctgcc cctctggcac ctagaacgc agttctgtca
2041 gtagttgaca cacctaggcc atttactga aggaaattat aatctcttaa agaataattg
2101 tcacatctca cgtaagcttg tttgttagaa ttagcgggaa ataatgttct tttaaaaaaa
2341 ggacagatgg taccctcact gcagtgctct agggaccag ggaaggccg ttgctgggag
2401 cctaccacc tgctagagct gtccccacct gaatggatgg atgatggatg gcaggaagta
2461 ccagtagatg acaaatgtca caccctcct gttagtgcc tgctagggga tatagtagca
2521 gagtctttgt cacaattgtg ctgttctgct gttttagaga ttaatctgtg taaactgtac
2581 attaccgttg tctatctttg ggcaggggga agtgcatata atgatttaat tgtacgtcag
2641 tgagatattt gcttatttat attcaaatat atatcatggt aaagagacat ctgtattttt
2701 cttcccattt gtaatgtatc ttatttatat attaattggag taagttctgg atactgttta
2761 tggatatttc gtgattttg gagccaaaga gaaaagatga aaattagtga gacttgcatt
2821 tatatttgag tgcccttaac ataattgatt gaacacatgt gtactgtctg gaaacgaatt
2881 ctgatactgt acatagatg gcgttatgga aatcttgctt cagtagcctt tgctcttctc
2941 tttccccct caggctgtac gtcagggtt ctcaaagctt ttctagtaac tgttgaaaaa
3001 taatgactag atctcctgta atttttagt agtatatgac caatctctgt gactcgctta
3061 gctgaaacct aaggctatgt ttccgaagat ctccgataca ctgaccagtc ccacaaggtg
3121 ttttgaagac atgaaacca cactgtgcat ttagatgatg caagaagaat ataaataaaa
3181 taaaaaatat tctccatgaa aaaaaaaaa aaaaaa

```

## 12. REFERENCIAS

---

- Arancibia, S., Rage, F., Astier, H., & Tapia-Arancibia, L. (1996). Neuroendocrine and autonomous mechanisms underlying thermoregulation in cold environment. *Neuroendocrinology*, *64*(4), 257-267. doi:10.1159/000127126
- Balkan, W., Tavianini, M. A., Gkonos, P. J., & Roos, B. A. (1998). Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology*, *139*(1), 252-259. doi:10.1210/endo.139.1.5684
- Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. (2002). Genetic approaches to studying energy balance: perception and integration. *Nat Rev Genet*, *3*(8), 589-600. doi:10.1038/nrg862
- Boelen, A., Wiersinga, W. M., & Fliers, E. (2008). Fasting-induced changes in the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Thyroid*, *18*(2), 123-129. doi:10.1089/thy.2007.0253
- Bouret, S. G., Draper, S. J., & Simerly, R. B. (2004). Formation of projection pathways from the arcuate nucleus of the hypothalamus to hypothalamic regions implicated in the neural control of feeding behavior in mice. *J Neurosci*, *24*(11), 2797-2805. doi:10.1523/JNEUROSCI.5369-03.2004
- Bowers, G., Cullinan, W. E., & Herman, J. P. (1998). Region-specific regulation of glutamic acid decarboxylase (GAD) mRNA expression in central stress circuits. *J Neurosci*, *18*(15), 5938-5947. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9671680>
- Broberger, C., Johansen, J., Johansson, C., Schalling, M., & Hokfelt, T. (1998). The neuropeptide Y/agouti gene-related protein (AgRP) brain circuitry in normal, anorectic, and monosodium glutamate-treated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(25), 15043-15048. doi:10.1073/pnas.95.25.15043
- Cabral, A., Fernandez, G., & Perello, M. (2013). Analysis of brain nuclei accessible to ghrelin present in the cerebrospinal fluid. *Neuroscience*, *253*, 406-415. doi:10.1016/j.neuroscience.2013.09.008
- Cote-Velez, A., Perez-Martinez, L., Diaz-Gallardo, M. Y., Perez-Monter, C., Carreon-Rodriguez, A., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (2005). Dexamethasone

- represses cAMP rapid upregulation of TRH gene transcription: identification of a composite glucocorticoid response element and a cAMP response element in TRH promoter. *J Mol Endocrinol*, 34(1), 177-197. doi:10.1677/jme.1.01634
- Curran-Rauhut MA, Petersen SL. (2002). Regulation of glutamic acid decarboxylase 65 and 67 gene expression by ovarian steroids: identification of two functionally distinct populations of GABA neurones in the preoptic area. *J Neuroendocrinol*. Apr;14(4):310-7. doi: 10.1046/j.1365-2826.2002.00780.x.
- Dale Purves, G. J. A., David Fitzpatrick, William C. Hall, Anthony Samuel Lamantia, James O. McNamara, S. Mark Williams. (2008). *Neurociencia 3a Edición Purves*.
- Dos-Santos, R. C., Reis, L. C., Perello, M., Ferguson, A. V., & Mecawi, A. S. (2019). The actions of ghrelin in the paraventricular nucleus: energy balance and neuroendocrine implications. *Ann N Y Acad Sci*, 1455(1), 81-97. doi:10.1111/nyas.14087
- Dyess, E. M., Segerson, T. P., Liposits, Z., Paull, W. K., Kaplan, M. M., Wu, P., . . . Lechan, R. M. (1988). Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 123(5), 2291-2297. doi:10.1210/endo-123-5-2291
- Erickson, J. D., De Gois, S., Varoqui, H., Schafer, M. K., & Weihe, E. (2006). Activity-dependent regulation of vesicular glutamate and GABA transporters: a means to scale quantal size. *Neurochem Int*, 48(6-7), 643-649. doi:10.1016/j.neuint.2005.12.029
- Esclapez, M., Tillakaratne, N. J., Kaufman, D. L., Tobin, A. J., & Houser, C. R. (1994). Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J Neurosci*, 14(3 Pt 2), 1834-1855. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126575>
- Esclapez, M., Tillakaratne, N. J., Tobin, A. J., & Houser, C. R. (1993). Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase

- with nonradioactive in situ hybridization methods. *J Comp Neurol*, 331(3), 339-362. doi:10.1002/cne.903310305
- Fekete, C., Kelly, J., Mihaly, E., Sarkar, S., Rand, W. M., Legradi, G., . . . Lechan, R. M. (2001). Neuropeptide Y has a central inhibitory action on the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, 142(6), 2606-2613. doi:10.1210/endo.142.6.8207
- Fekete, C., & Lechan, R. M. (2014). Central regulation of hypothalamic-pituitary-thyroid axis under physiological and pathophysiological conditions. *Endocr Rev*, 35(2), 159-194. doi:10.1210/er.2013-1087
- Fekete, C., Legradi, G., Mihaly, E., Huang, Q. H., Tatro, J. B., Rand, W. M., . . . Lechan, R. M. (2000). alpha-Melanocyte-stimulating hormone is contained in nerve terminals innervating thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone gene expression. *J Neurosci*, 20(4), 1550-1558. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10662844>
- Fekete, C., Mihaly, E., Luo, L. G., Kelly, J., Clausen, J. T., Mao, Q., . . . Lechan, R. M. (2000). Association of cocaine- and amphetamine-regulated transcript-immunoreactive elements with thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and its role in the regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis during fasting. *J Neurosci*, 20(24), 9224-9234. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125000>
- Fekete, C., Sarkar, S., & Lechan, R. M. (2005). Relative contribution of brainstem afferents to the cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) innervation of thyrotropin-releasing hormone synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN). *Brain Res*, 1032(1-2), 171-175. doi:10.1016/j.brainres.2004.10.069
- Fekete, C., Wittmann, G., Liposits, Z., & Lechan, R. M. (2002). GABA-ergic innervation of thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res*, 957(2), 251-258. doi:10.1016/s0006-8993(02)03576-x

- Fekete, C., Wittmann, G., Liposits, Z., & Lechan, R. M. (2004). Origin of cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART)-immunoreactive innervation of the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Comp Neurol*, *469*(3), 340-350. doi:10.1002/cne.10999
- Freneau, R. T., Jr., Burman, J., Qureshi, T., Tran, C. H., Proctor, J., Johnson, J., . . . Edwards, R. H. (2002). The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(22), 14488-14493. doi:10.1073/pnas.222546799
- Gehlert, D. R. (1999). Role of hypothalamic neuropeptide Y in feeding and obesity. *Neuropeptides*, *33*(5), 329-338. doi:10.1054/npep.1999.0057
- George Paxinos, K. B. J. F. (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (second ed.): Academic Press.
- Ghamari-Langroudi, M., Vella, K. R., Srisai, D., Sugrue, M. L., Hollenberg, A. N., & Cone, R. D. (2010). Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular nucleus of the hypothalamus by signals of adiposity. *Mol Endocrinol*, *24*(12), 2366-2381. doi:10.1210/me.2010-0203
- Gotoh, K., Masaki, T., Chiba, S., Ando, H., Shimasaki, T., Mitsutomi, K., . . . Yoshimatsu, H. (2013). Nesfatin-1, corticotropin-releasing hormone, thyrotropin-releasing hormone, and neuronal histamine interact in the hypothalamus to regulate feeding behavior. *J Neurochem*, *124*(1), 90-99. doi:10.1111/jnc.12066
- Gras, C., Herzog, E., Bellenchi, G. C., Bernard, V., Ravassard, P., Pohl, M., . . . El Mestikawy, S. (2002). A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci*, *22*(13), 5442-5451. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12097496>
- Hahn, T. M., Breininger, J. F., Baskin, D. G., & Schwartz, M. W. (1998). Coexpression of AgRP and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci*, *1*(4), 271-272. doi:10.1038/1082
- Hanno-lijima, Y., Tanaka, M., & Iijima, T. (2015). Activity-Dependent Bidirectional Regulation of GAD Expression in a Homeostatic Fashion Is Mediated by BDNF-Dependent and Independent Pathways. *PLoS One*, *10*(8), e0134296. doi:10.1371/journal.pone.0134296



- Hinoi, E., Takarada, T., Tsuchihashi, Y., & Yoneda, Y. (2005). Glutamate transporters as drug targets. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4(2), 211-220. doi:10.2174/1568007053544093
- Hollenberg, A. N., Monden, T., Flynn, T. R., Boers, M. E., Cohen, O., & Wondisford, F. E. (1995). The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*, 9(5), 540-550. doi:10.1210/mend.9.5.7565802
- Hrabovszky E, Turi GF, Kalló I, Liposits Z. (2004). Expression of vesicular glutamate transporter-2 in gonadotropin-releasing hormone neurons of the adult male rat. *Endocrinology*. Sep;145(9):4018-21. doi: 10.1210/en.2004-0589.
- Hrabovszky, E., & Liposits, Z. (2008). Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system. *J Neuroendocrinol*, 20(6), 743-751. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01719.x
- Hrabovszky, E., Wittmann, G., Turi, G. F., Liposits, Z., & Fekete, C. (2005). Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone neurons of the rat contain vesicular glutamate transporter-2. *Endocrinology*, 146(1), 341-347. doi:10.1210/en.2004-0856
- Jaimes-Hoy, L., Gutierrez-Mariscal, M., Vargas, Y., Perez-Maldonado, A., Romero, F., Sanchez-Jaramillo, E., . . . Joseph-Bravo, P. (2016). Neonatal Maternal Separation Alters, in a Sex-Specific Manner, the Expression of TRH, of TRH-Degrading Ecto-enzyme in the Rat Hypothalamus, and the Response of the Thyroid Axis to Starvation. *Endocrinology*, 157(8), 3253-3265. doi:10.1210/en.2016-1239
- Joseph-Bravo, P., Uribe, R. M., Vargas, M. A., Perez-Martinez, L., Zoeller, T., & Charli, J. L. (1998). Multifactorial modulation of TRH metabolism. *Cell Mol Neurobiol*, 18(2), 231-247. doi:10.1023/a:1022521020840
- Joseph-Bravo P, Lazcano I, Jaimes-Hoy L, Gutierrez-Mariscal M, Sanchez-Jaramillo E, Uribe RM, Charli JL. Sexually dimorphic dynamics of thyroid axis activity during fasting in rats. (2020). *Front Biosci (Landmark Ed)*, 25:1305-1323
- Kadar, A., Sanchez, E., Wittmann, G., Singru, P. S., Fuzesi, T., Marsili, A., . . . Fekete, C. (2010). Distribution of hypophysiotropic thyrotropin-releasing

- hormone (TRH)-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the mouse. *J Comp Neurol*, 518(19), 3948-3961. doi:10.1002/cne.22432
- Kakucska, I., Qi, Y., & Lechan, R. M. (1995). Changes in adrenal status affect hypothalamic thyrotropin-releasing hormone gene expression in parallel with corticotropin-releasing hormone. *Endocrinology*, 136(7), 2795-2802. doi:10.1210/endo.136.7.7789304
- Kakucska, I., Romero, L. I., Clark, B. D., Rondeel, J. M., Qi, Y., Alex, S., . . . Lechan, R. M. (1994). Suppression of thyrotropin-releasing hormone gene expression by interleukin-1-beta in the rat: implications for nonthyroidal illness. *Neuroendocrinology*, 59(2), 129-137. doi:10.1159/000126649
- Kallo, I., Mohacsik, P., Vida, B., Zeold, A., Bardoczi, Z., Zavacki, A. M., . . . Gereben, B. (2012). A novel pathway regulates thyroid hormone availability in rat and human hypothalamic neurosecretory neurons. *PLoS One*, 7(6), e37860. doi:10.1371/journal.pone.0037860
- Kaufman, D. L., Houser, C. R., & Tobin, A. J. (1991). Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J Neurochem*, 56(2), 720-723. doi:10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x
- Krashes, M. J., Shah, B. P., Madara, J. C., Olson, D. P., Strohlic, D. E., Garfield, A. S., . . . Lowell, B. B. (2014). An excitatory paraventricular nucleus to AgRP neuron circuit that drives hunger. *Nature*, 507(7491), 238-242. doi:10.1038/nature12956
- 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. doi:10.1210/en.2014-1885
- Lechan, R. M., & Fekete, C. (2005). Role of thyroid hormone deiodination in the hypothalamus. *Thyroid*, 15(8), 883-897. doi:10.1089/thy.2005.15.883
- Lechan RM, T. R. (1992). *Thyrotropin-releasing hormone neuronal systems in the central nervous system*. . CRC Press: Boca Raton.

- Lechan, R. M., Wu, P., Jackson, I. M., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., & Goodman, R. H. (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science*, *231*(4734), 159-161. doi:10.1126/science.3079917
- Lee, S. L., Stewart, K., & Goodman, R. H. (1988). Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem*, *263*(32), 16604-16609. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2903153>
- Legradi, G., Emerson, C. H., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Lechan, R. M. (1997). Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, *138*(6), 2569-2576. doi:10.1210/endo.138.6.5209
- Legradi, G., & Lechan, R. M. (1998). The arcuate nucleus is the major source for neuropeptide Y-innervation of thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, *139*(7), 3262-3270. doi:10.1210/endo.139.7.6113
- Legradi, G., & Lechan, R. M. (1999). Agouti-related protein containing nerve terminals innervate thyrotropin-releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, *140*(8), 3643-3652. doi:10.1210/endo.140.8.6935
- Lein, E. S., Hawrylycz, M. J., Ao, N., Ayres, M., Bensinger, A., Bernard, A., . . . Jones, A. R. (2007). Genome-wide atlas of gene expression in the adult mouse brain. *Nature*, *445*(7124), 168-176. doi:10.1038/nature05453
- Lopez-Gambero, A. J., Martinez, F., Salazar, K., Cifuentes, M., & Nualart, F. (2019). Brain Glucose-Sensing Mechanism and Energy Homeostasis. *Mol Neurobiol*, *56*(2), 769-796. doi:10.1007/s12035-018-1099-4
- Marsili, A., Sanchez, E., Singru, P., Harney, J. W., Zavacki, A. M., Lechan, R. M., & Larsen, P. R. (2011). Thyroxine-induced expression of pyroglutamyl peptidase II and inhibition of TSH release precedes suppression of TRH mRNA and requires type 2 deiodinase. *J Endocrinol*, *211*(1), 73-78. doi:10.1530/JOE-11-0248

- Martin, D. L., & Rimvall, K. (1993). Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J Neurochem*, *60*(2), 395-407. doi:10.1111/j.1471-4159.1993.tb03165.x
- Matsumoto, T., Numakawa, T., Yokomaku, D., Adachi, N., Yamagishi, S., Numakawa, Y., . . . Taguchi, T. (2006). Brain-derived neurotrophic factor-induced potentiation of glutamate and GABA release: different dependency on signaling pathways and neuronal activity. *Mol Cell Neurosci*, *31*(1), 70-84. doi:10.1016/j.mcn.2005.09.002
- Mihaly, E., Fekete, C., Tatro, J. B., Liposits, Z., Stopa, E. G., & Lechan, R. M. (2000). Hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the human hypothalamus are innervated by neuropeptide Y, agouti-related protein, and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, *85*(7), 2596-2603. doi:10.1210/jcem.85.7.6662
- Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*, *3*(9), 715-727. doi:10.1038/nrn919
- Perez-Martinez, L., Carreon-Rodriguez, A., Gonzalez-Alzati, M. E., Morales, C., Charli, J. L., & Joseph-Bravo, P. (1998). Dexamethasone rapidly regulates TRH mRNA levels in hypothalamic cell cultures: interaction with the cAMP pathway. *Neuroendocrinology*, *68*(5), 345-354. doi:10.1159/000054383
- R., B. O. V. u. H. D. ((2002).). *Neurotransmitters and Neuromodulators, Handbook of Receptors and Biological Effects* (2nd ed.). Alemania: Wiley-VCH Press.
- Sainsbury, A., & Zhang, L. (2012). Role of the hypothalamus in the neuroendocrine regulation of body weight and composition during energy deficit. *Obes Rev*, *13*(3), 234-257. doi:10.1111/j.1467-789X.2011.00948.x
- Sanchez, E., Singru, P. S., Acharya, R., Bodria, M., Fekete, C., Zavacki, A. M., . . . Lechan, R. M. (2008). Differential effects of refeeding on melanocortin-responsive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, *149*(9), 4329-4335. doi:10.1210/en.2008-0411
- Sanchez, E., Uribe, R. M., Corkidi, G., Zoeller, R. T., Cisneros, M., Zacarias, M., . . . Joseph-Bravo, P. (2001). Differential responses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) neurons to cold exposure or suckling indicate functional

- heterogeneity of the TRH system in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, 74(6), 407-422. doi:10.1159/000054707
- 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. doi:10.1210/en.2008-1643
- Satoh, T., Yamada, M., Iwasaki, T., & Mori, M. (1996). Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *J Biol Chem*, 271(44), 27919-27926. doi:10.1074/jbc.271.44.27919
- Schafer, M. K., Varoqui, H., Defamie, N., Weihe, E., & Erickson, J. D. (2002). Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem*, 277(52), 50734-50748. doi:10.1074/jbc.M206738200
- Scott, A., Alfredson, H., & Forsgren, S. (2008). VGlut2 expression in painful Achilles and patellar tendinosis: evidence of local glutamate release by tenocytes. *J Orthop Res*, 26(5), 685-692. doi:10.1002/jor.20536
- Segerson, T. P., Kauer, J., Wolfe, H. C., Mobtaker, H., Wu, P., Jackson, I. M., & Lechan, R. M. (1987). Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science*, 238(4823), 78-80. doi:10.1126/science.3116669
- Shioda, S., & Nakai, Y. (1993). Medullary synaptic inputs to thyrotropin-releasing hormone (TRH)-containing neurons in the hypothalamus: an ultrastructural study combining WGA-HRP anterograde tracing with TRH immunocytochemistry. *Brain Res*, 625(1), 9-15. doi:10.1016/0006-8993(93)90131-6
- Swanson, L. W., & Kuypers, H. G. (1980). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by

- retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol*, 194(3), 555-570. doi:10.1002/cne.901940306
- Szabo, G., Katarova, Z., Kortvely, E., Greenspan, R. J., & Urban, Z. (1996). Structure and the promoter region of the mouse gene encoding the 67-kD form of glutamic acid decarboxylase. *DNA Cell Biol*, 15(12), 1081-1091. doi:10.1089/dna.1996.15.1081
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2000). Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature*, 407(6801), 189-194. doi:10.1038/35025070
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C., & Jahn, R. (2001). Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGluT2). *J Neurosci*, 21(22), RC182. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698620>
- Tischler, M. E., Henriksen, E. J., & Cook, P. H. (1988). Role of glucocorticoids in increased muscle glutamine production in starvation. *Muscle Nerve*, 11(7), 752-756. doi:10.1002/mus.880110711
- Uezato, A., Meador-Woodruff, J. H., & McCullumsmith, R. E. (2009). Vesicular glutamate transporter mRNA expression in the medial temporal lobe in major depressive disorder, bipolar disorder, and schizophrenia. *Bipolar Disord*, 11(7), 711-725. doi:10.1111/j.1399-5618.2009.00752.x
- Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli JL. (1991). Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology*, 54(5), 493-8. doi: 10.1159/000125943
- Wei, J., Davis, K. M., Wu, H., & Wu, J. Y. (2004). Protein phosphorylation of human brain glutamic acid decarboxylase (GAD)65 and GAD67 and its physiological implications. *Biochemistry*, 43(20), 6182-6189. doi:10.1021/bi0496992
- Wittmann, G., Lechan, R. M., Liposits, Z., & Fekete, C. (2005). Glutamatergic innervation of corticotropin-releasing hormone- and thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res*, 1039(1-2), 53-62. doi:10.1016/j.brainres.2005.01.090

- Wittmann, G., Liposits, Z., Lechan, R. M., & Fekete, C. (2002). Medullary adrenergic neurons contribute to the neuropeptide Y-ergic innervation of hypophysiotropic thyrotropin-releasing hormone-synthesizing neurons in the rat. *Neurosci Lett*, *324*(1), 69-73. doi:10.1016/s0304-3940(02)00165-9
- Wittmann, G., Sarkar, S., Hrabovszky, E., Liposits, Z., Lechan, R. M., & Fekete, C. (2004). Galanin- but not galanin-like peptide-containing axon terminals innervate hypophysiotropic TRH-synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res*, *1002*(1-2), 43-50. doi:10.1016/j.brainres.2003.12.022
- Wittmann, G., Szabon, J., Mohacsik, P., Nouriel, S. S., Gereben, B., Fekete, C., & Lechan, R. M. (2015). Parallel regulation of thyroid hormone transporters OATP1c1 and MCT8 during and after endotoxemia at the blood-brain barrier of male rodents. *Endocrinology*, *156*(4), 1552-1564. doi:10.1210/en.2014-1830
- Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B., & Bloom, S. (2005). Appetite control. *J Endocrinol*, *184*(2), 291-318. doi:10.1677/joe.1.05866
-